

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ULTRASOUND HOMOJENİZASYONUN KARACİĞER
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, GLUTASYON PEROKSİDAZ,
KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE VE LİPİT PEROKSİT
DÜZEYLERİNE ETKİLERİ**

Deniz SAĞLAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR**

KONYA- 2011

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ULTRASOUND HOMOJENİZASYONUN KARACİĞER
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, GLUTASYON PEROKSİDAZ,
KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE VE LİPİT PEROKSİT
DÜZEYLERİNE ETKİLERİ**

Deniz SAĞLAM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10202003 Proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2011

i. ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Deniz SAĞLAM tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Emrah SUR

Selçuk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR

Selçuk Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Zafer BULUT

Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Orhan ÇETİN

Enstitü Müdürü

ii. ÖNSÖZ

Hücre bütünlüğünü bozarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde fiziksel ya da kimyasal tekniklere dayanır. Geliştirilen çeşitli teknikler sayesinde bir dokudaki farklı hücre tiplerini birbirinden ayırmak mümkün olduğu gibi dikkatli bir çalışma ile organeller de ayrımlanabilir. Çalışılacak molekül grubunu (nükleik asit ya da protein) içeren doku hücrelerinin çeper ve membran bütünlüğünün bozulmasına homojenizasyon denir. Hücre bütünlüğünün bozulması, kimyasal yöntemlerde; çözücülerle (organik solventler, deterjanlar), enzimlerle, fiziksel yöntemlerde; dondurma/çözdürme, osmotik şok, mekanik ve ultrasonikasyonla yapılabilir.

Bu tez çalışması, karaciğer antioksidasyon kapasitesinin belirlenmesinde önemli olan SOD, GPx, CAT enzim aktivitelerine ve serbest radikal oluşumunun göstergesi olarak LPO düzeylerine ultrasonik homojenizasyonun etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmanın projelendirilmesi ve yürütülmesi aşamalarında yardımını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışmanın yürütülmesinde her türlü olanağı hazırlayan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın Pınar Peker AKALIN'a, manevi desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan ablam Yeliz SAVCI, babam Servet SAĞLAM, annem Sultan SAĞLAM ve çalışmamın değişik aşamalarında bana yardımcı olan herkese, teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

iii. SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| ATP | Adenozin Trifosfat |
| BaTiO₃ | Baryum titanat |
| Cu | Bakır |
| dB | Desibel |
| dk | Dakika |
| ESR | Elektron Spin Rezonans |
| Fe | Demir |
| g | Gram |
| GSH | Glutasyon |
| GSSG | Okside glutasyon |
| GSH-Px | Glutasyon peroksidaz |
| GSSR-R | Glutasyon redüktaz |
| GST | Glutasyon S-transferaz |
| H₂O₂ | Hidrojen peroksit |
| Hz | Hertz |
| Ig G | İmmünoglobülin G |
| K | Kelvin |
| CAT | Katalaz |
| KC | Karaciğer |
| KHz | Kilohertz |
| LPO | Lipit peroksit |
| M | Mekanik homojenizasyon |
| MD | Mekanik+dithioerythritol |
| MDA | Malondialdehid |
| mg | Miligram |
| MHz | Megahertz |
| ml | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| Mn | Manganez |
| Mo | Molibden |
| MSD | Mekanik+sonikasyon+dithioerythritol |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MS | Mekanik+ sonikasyon |
| NADPH | Nikotinamid dinükleotid fosfataz |
| nm | Nanometre |
| nmol | Nanomol |
| NO | Nitrik oksit |
| NO₂ | Nitrik dioksit |
| NO₂⁻ | Nitrit |
| NO₃⁻ | Nitrat |
| NO₂⁺ | Nitronyum iyonu |
| NO₂[•] | Azot dioksit |
| O₃ | Ozon |
| O₂[•] | Süperoksid |
| O[•] | Singlet oksijen |
| OH⁻ | Hidroksil |
| ONOO⁻ | Peroksinitrit |
| PbNb₂O₆ | Kurşun metabionat |
| PLGSH-Px | Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz |
| pO₂ | Parsiyel oksijen basıncı |
| PZT | Kurşun zirkonat titanat |
| RA | Romotoit artrit |
| ROO[•] | Peroksi radikali |
| ROS | Reaktif oksijen ürünü |
| R[•] | Organik radikaller |
| RS[•] | Tiyil radikalleri |
| S | Sonikasyon |
| SD | Sonikasyon+ dithioerythritol |
| SH | Sülfidril |
| SLE | Sistemik lupus eritematozus |
| sn | Saniye |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| TP | Total protein |
| Vit E | α -Tokoferol |
| Vit C | Askorbat |
| W | Watt |

iv. İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----|
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1.Homojenizasyon..... | 3 |
| 1.1.1.Homojenizasyon Yöntemleri..... | 3 |
| Kimyasal yöntemler..... | 3 |
| Fiziksel yöntemler..... | 4 |
| 1.2.Ultrasonik Dalgaların Tarihçesi | 4 |
| 1.3 Ses ve Ultrasonik Dalgaların Fiziği | 5 |
| 1.4. Hız, Dalga Boyu, Frekans..... | 7 |
| 1.5.Yansıma, Saçılma, Kırılma Ve Zayıflama..... | 9 |
| 1.6. Ultrasonik Dalga Üretimi..... | 10 |
| 1.7. Piezoelektrik Etki..... | 11 |
| 1.8. Ultrasonik Dalgaların Kullanım Alanları | 12 |
| 1.9. Ultrasonik Dalgaların Kimyasal Tepkimeler Üzerine Etkileri | 13 |
| 1.10. Kavitasyon..... | 13 |
| 1.10.1. Kavitasyonu etkileyen faktörler..... | 15 |
| 1.11. Sonokimyasal Tepkime Teorileri..... | 17 |
| 1.12. Ultrasonik Homojenizasyon..... | 19 |
| 1.13. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Sistemler..... | 20 |
| 1.13.1. Reaktif Oksijen Türleri..... | 21 |
| Süperoksit radikali (O_2^{\bullet}) | 21 |
| Hidrojen peroksit (H_2O_2)..... | 22 |
| Hidroksil radikali (OH^{\bullet})..... | 23 |
| Singlet oksijen (O^{\bullet})..... | 23 |
| 1.13.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri..... | 24 |
| Serbest radikallerin lipidlere etkileri..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| Serbest radikallerin proteinlere etkileri..... | 25 |
| Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi..... | 25 |
| Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA' ya etkileri..... | 26 |
| 1.13.3. Antioksidan Savunma Sistemleri..... | 26 |
| Endojen antioksidanlar..... | 27 |
| Süperoksit dismutaz | 27 |
| Katalaz..... | 28 |
| Glutasyon peroksidaz..... | 28 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 30 |
| 2.1. Gereç..... | 30 |
| 2.2. Yöntem..... | 30 |
| 2.2.3. Antioksidan Enzim Aktivite Düzeylerinin Ölçümü..... | 31 |
| Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeylerinin belirlenmesi..... | 31 |
| Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi..... | 32 |
| Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi..... | 33 |
| Lipit peroksidasyon (LPO) ürünleri düzeyinin belirlenmesi..... | 33 |
| Total protein düzeylerinin belirlenmesi..... | 34 |
| 2.3. İstatistiksel Değerlendirme..... | 34 |
| 3. BULGULAR..... | 35 |
| 4. TARTIŞMA..... | 38 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 41 |
| 6.ÖZET..... | 42 |
| 7.SUMMARY..... | 43 |
| 8.KAYNAKLAR..... | 44 |
| 9.ÖZGEÇMİŞ..... | 46 |

1.GİRİŞ

Sonokimya, kimyasal yöntemlerde ses (sonik) ve ses ötesi (ultrasonik) dalga uygulamalarını içermektedir. Sonokimyayı yürüten güç kavitasyondur (Adewuyi ve ark 2001). Ultrasonik enerjinin kimyasal gücü kavitasyon ile ortaya çıkmaktadır. Kavitasyon negatif basınç uygulanan sıvıda mikrobaloncukların oluşması olayıdır. Bütün ses dalgaları gibi, ultrasonik ses dalgaları da sıvı içinde dalgalar halinde iletilmektedir. Ses dalgaları içinden geçtiği ortamın, moleküler yapısında daralma ve genişlemeye yol açar. Eğer yeterli miktarda negatif basınç sıvıya uygulanırsa, sıvı bütünlüğünü sağlamak için gerekli olan kritik mesafe aşılacaktır. Sıvıda boşluklar oluşacak ve parçalanma (yarılma) meydana gelecektir. Bu boşluklara “kavitasyon baloncukları” adı verilir. Bu baloncuklar birbirleri ile sürekli olarak çarpışarak büyümekte, böylece kuvvetli lokal bir enerji açığa çıkmaktadır (bilesim.com.tr 2008). Ultrasonik dalgaların kimyasal ve mekanik etkileri, kavitasyon kabarcıkları tarafından meydana gelmektedir. Kavitasyon kabarcıklarının genişleme sırasında büyümeleri için geçen süre, büzüşme sırasındaki daralmalarına göre daha fazladır. Bu durum sıvı fazda oluşan kabarcıkların gaz ya da buhar olarak eşit olmayan dağılımına bağlıdır. Sıvıda yer alan bu kabarcıklar içinde yüksek sıcaklık ve basınç meydana gelmektedir (Suslick 1988). Kavitasyon oluşumunda öncelikli olarak moleküler arası Van der Waals bağlarının, daha ileri aşamada da kovalent bağların kopması için yeterli enerji açığa çıkabilir (nirosoavi.com.tr 2009). Bütün organik sıvılarda ultrasonik ısınmayla serbest radikaller açığa çıkar. Serbest radikaller çok reaktif molekül olmalarından dolayı anselektif (seçici olmayan) tepkimeye girer, lipid peroksidasyonu ile hücre membran yapısını bozarak, biyolojik yapılara zarar verebilir (Karabiga ve ark 2007).

Dokularla ilgili biyokimyasal analizlerde yaygın olarak mekanik homojenizasyon yöntemleri uygulanmaktadır. Homojenizasyon sonrası elde edilen homojenat, bütünlüğü bozulmamış birçok organel ve moleküller içerir. Homojenizasyon sıvısı doku intrasellüler içeriklerini tam olarak yansıtmaz. Buna karşın ultrasonik homojenizasyonda (sonikasyon) ise tüm hücre organellerinin parçalanması amaçlanır. Ancak sonikasyonda çoğu organik moleküller için istenmeyen bozucu etkiler olarak yüksek ısı ve çok reaktif serbest radikaller açığa çıkar. Bu sıcaklık artışı dokuda hasara sebep olabilir (Kavutçu 2006).

Bu çalışmanın amacı; karaciğer antioksidasyon kapasitesinin belirlenmesinde önemli olan SOD, GPx, Katalaz enzim aktivitelerine ve serbest radikal oluşumunun göstergesi olarak LPO düzeylerine ultrasonik homojenizasyonun etkilerinin belirlenmesidir.

1.1. Homojenizasyon

Doku bütünlüğünü bozarak fraksiyonlara ayırma yöntemleri temelde fiziksel ya da kimyasal tekniklere dayanır. Geliştirilen çeşitli tekniklerle dokudaki farklı hücre tiplerini birbirinden ayırmak mümkün olduğu gibi organeller de ayrımlanabilir. Bir organel veya molekülü hücrelerden ekstrakte etmek için hücreyi uygun koşullarda parçalama işlemine homojenizasyon denir. Hücre bütünlüğünün bozulması kimyasal yöntemlerde; çözücülerle (organik solventler, deterjanlar) ve enzimlerle, fiziksel yöntemlerde; dondurma/çözdürme, osmotik şok ve mekanik olarak yapılabilir. Bu yöntemlerle elde edilen homojenat, bütünlüğü bozulmamış birçok organel ve molekül içerir (Altınışık 2009).

Hücreleri parçalamak için yaygın olarak kullanılan metodlardan birtanesi de, ultrasonik ses dalgaları olarak kabul edilen 20 ile 100 MHz aralığındaki boyuna ses dalgalarıyla yapılan ultrasonik homojenizasyondur.

1.1.1. Homojenizasyon Yöntemleri

Homojenizasyon tipleri, genel olarak kimyasal ve fiziksel olarak ikiye ayrılır.

Kimyasal yöntemler

Çözücülerin Kullanılması: Membran yapısını oluşturan makromoleküllerin çözüldüğü uygun bir solvent (çözücü) yardımıyla zar yapısının bütünlüğünün bozulmasıdır. Bu amaçla kullanılan organik çözücüler (örneğin, etil asetat, toluen vb) zardaki lipitleri, deterjanlar ise uygun şartlarda protein ve lipoprotein ile etkileşime girer ve bunlar uzaklaştırılır.

Enzimlerin kullanılması: Bu amaçla kullanılan litik enzimler özellikle mikroorganizmalar için uygundur. Gram (+)' lerde bakteri duvarının yıkılması için lizozim enzimi kullanılırken Gram (-)' lerde ise EDTA (kimyasal) uygulamasına tabi tutulması gerekmektedir.

Kimyasal parçalama yöntemleri ısı, yüksek basınç, gürültü gibi olumsuz faktörlerin ortaya çıkmaması gibi nedenlerle fiziksel yöntemlere göre daha çok tercih edilir (Surgun 2009).

Fiziksel yöntemler

Dondurma-Çözdürme: Hücrelerin çok düşük sıcaklık derecelerinde (örneğin -20°C) tutulup sonra yeniden ısıtılarak çözdürülmesi ve bu işlemin birkaç kez tekrarlanması parçalanmaya yol açar.

Osmotik Şok: Hücre duvarı (çeperi) bulunmayan hücreler için uygun olan ve hücrelerin yüksek osmotik basınçlı bir çözeltiliden, hipotonik bir ortama geçirilmesi durumunda, suyun hücrelerin içine girmesi ile membran bütünlüğünün bozulmasıyla meydana gelen homojenizasyondur.

Mekanik Yöntemler: Bu tip tekniklerin en basit olanı, materyali bir havan içinde kum ile öğütmektir. Ezme sırasında alumina, kum ya da cam tozu katılacak olursa parçalama etkinliği artar. Doku veya hücreler (liquid N₂) sıvı azotta (-196°C) ya da $-20, -70^{\circ}\text{C}$ ' da dondurularak soğuk havanlarda dövülerek, ezerek parçalama işlemi yapılır. Donmuş olan dokular toz hale gelene kadar kolaylıkla parçalanabilir, ancak işlem dokularda çözünme olmadan kısa sürede bitirilmelidir.

Ultrasonikasyon: Hücre süspansiyonuna daldırılan sonikatör, titreşim yaparak, yüksek ses dalgalarıyla hücre bütünlüğünü bozar. Bu amaçla kullanılan aletler (Ultrasonikatör) elektrik enerjisini kesikli karakterde mekanik enerjiye çevirerek, titanyumdan yapılmış sonda yardımıyla ultrases dalgalarını solüsyon içindeki materyale iletir. Bu tür parçalama işlemleri sırasında açığa çıkan ısıyı engellemek için uygun soğutmaların yapılması gerekmektedir.

1.2. Ultrasonik Dalgaların Tarihçesi

Ultrasonik dalgalar insan kulağının işitemeyeceği frekanslara sahip ses dalgalarıdır. İnsan kulağı 16 siklus/saniye ile (en kalın ses), 20.000 siklus/saniye (Hertz) arası frekanstaki ses dalgalarını işitebilir. Hertz (Hz); saniyedeki dalgadır, Kilohertz (KHz); saniyede bin dalga ihtiva eden ses, Megahertz (MHz); saniyede 1 milyon dalga ihtiva eden sestir (Dinç 2008). Ultrasonik ses dalgaları insan duyma sınırının üzerinde 20 KHz ile 100 MHz aralığındaki boyuna dalgalarıdır. Ultrasonik enerji, yıllar boyunca mühendislik, bilim ve tıpta çok yaygın olarak kullanılmasına karşın, kimyadaki uygulamaları oldukça yenidir (Öner 2002, Gümüştöre 2007).

Ultrasonik dalgalar ve kavitasyonlar hakkında ilk bilgiler, 1895 yılında Thorncroft ve Bornaby'nin HMS Daring denizaltılarında pervanelerin oluşturduğu aşındırmaya dayanır. Bundan 22 yıl sonra 1917 de Lord Rayleing kavitasyon olayının ilk matematik model tanımını yayımlamıştır. 1927 yılına kadar, Richards ve Leomis kimyasal, Wood ve Loomis' de biyolojik etkileri artırmak amacıyla ultrasonik dalgaları kullanmışlardır. 1937 yılında Brohult biyolojik polimerlerin bozunmasında ultrasonik dalgaların etkilerini gözlemlemiş, Schmid ve Romel 1939' da sentetik polimerlerin bozunmasıyla ilgili metodlar geliştirmişlerdir (Thompson ve Doraiswamy 1999).

1944 yılında Harvey mikrobaloncukların titreşim süresince büyümesi fikrini ortaya atmış ve 1950 yılında Noltink ve Neppirs kavitasyon baloncuğunun bilgisayarla hesaplama modelini oluşturmuşlardır. 1954 yılında Elder ve arkadaşları, heterojen sistemlerde günümüzde iyi bilinen ultrasonik temizleme yöntemlerini önerdi. Elder 1960 yıllarında çoğunlukla biyolojik sistemlerde sonokimyasal etkilere yönelik yayınlar yaptı (Thompson ve Doraiswamy 1999).

1961 yılında akışkan sistemlerde ultrasonik dalgaların fiziksel etkilerinin arttığı anlaşıldı. Naude ve Ellis (1961) asimetrik kavitasyon oluşumu süresince mikro jet formlarının oluştuğu hipotezini ileri sürdü. Bu genel düşünce bugün hala geçerlidir. Bu düşünce akışkan yüzeylerindeki korozyonu ve heterojen sistemlerdeki tüm parçacık boyutlarının indirgenmesini açıklamak için kullanılır. 1963 yılında Weissler çevredeki tepkime sıcaklığının artışı ile sonokimyasal tepkimelerin hız azalışının ilk incelemelerini yaptı. 1964 yılında Flynn günümüzde kullanılan terimlerden 'süreksiz kavitasyon ve sürekli kavitasyon' kavramını kullanan ilk kişi oldu. 1982 yılında Makino ve arkadaşları suyun sonolizi süresince hidrojen ve hidroksil radikallerin oluştuğunu ESR (Elektron Spin Rezonans) ölçümüyle gösterdi. Bu yıllarda Warwick Üniversitesinde Sonokimyanın temelleri oluşturuldu. Ultrasonik ses dalgalarının kimyada kullanımı ile ilgili ilk yayın 1994 yılında 'Ultrasonics Sonochemistry' adıyla çıktı (Thompson ve Doraiswamy 1999).

1.3. Ses ve Ultrasonik Dalgaların Fiziği

Ses dalgaları, değişik ortamlar içinde yayılan boyuna dalgalardır. Bu dalgalar her hangi bir ortamda (yani gazlar, katılar veya sıvılar), ortamın özelliklerine bağlı olarak yayılırlar. Ses dalgası bir ortamda yayılırken; ortamın parçacıkları, dalganın

hareket doğrultusu boyunca yoğunluk ve hacim değişikliklerine yol açacak şekilde titreşirler. Ses dalgaları şeklinde ortaya çıkan yer değiştirmeler, denge konumundan itibaren her bir molekülün boyuna yer değiştirmesini gerektirir. Bu sıkışma ve genişleme şeklinde basınç (yüksek alçak basınç) değişimlerine yol açar (Halliday ve Resnick 1992). Frekanslarına göre ses dalgaları üçe ayrılır:

İşitilebilir dalgalar: İnsan kulağının duyarlılık sınırı içinde olan ses dalgalarıdır. Bu dalgalar 20 Hz ile 20 KHz (20 000 Hz) (16-20 000Hz) frekansları arasındadır. Bu sesler; farenksteki ses telleriyle, müzik aletleriyle ve hoparlör gibi farklı aletlerle oluşturabilirler.

Infrasonic (Ses altı) dalgalar: İşitilebilir düzeyin altındaki frekansta olan (deprem dalgaları) boyuna dalgalarıdır.

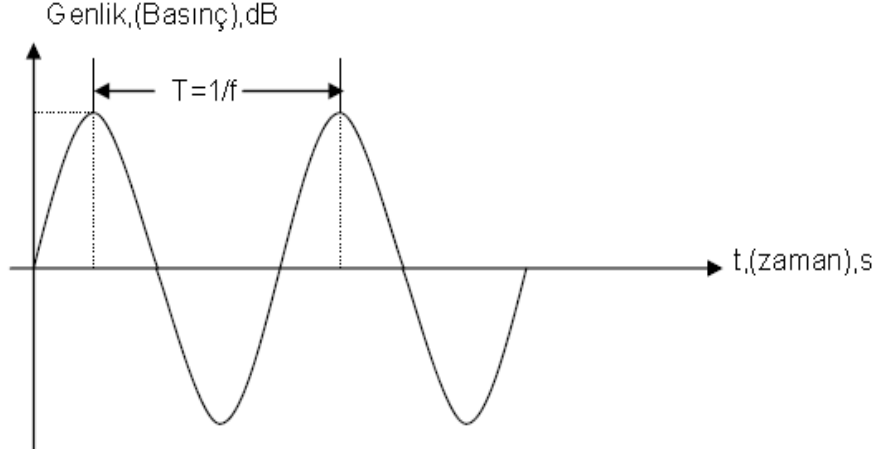
Ultrasonic (Ses ötesi) dalgalar: İşitilebilir seviyenin üstündeki ses dalgalarıdır. Bu ses dalgaları, kuvars kristaline alternatif elektrik akımı uygulanmasıyla elde edilebilir. Bu şekilde 6×10^8 Hz (600 000 000 Hz = 600 MHz) kadar yüksek frekans elde edilebilir. Bu frekansa karşılık gelen dalga boyu hava içinde 5×10^{-5} cm (0,00005 cm)' dir. Bu değer görünür ışık dalgalarının boyu ile aynı büyüklüktedir (Halliday ve Resnick 1992).

Megahertz (MHz) düzeyindeki sinyaller radyo frekans dalgaları olarak da adlandırılmasına karşın, radyo frekans dalgaları ile ultrasonik dalgalar arasında (aynı frekans bandında olmalarına karşın) yapı itibariyle bazı temel farklar bulunmaktadır. Ultrasonik dalgalar akustik yapıda iken, radyo frekans dalgaları elektromanyetik dalgalarıdır (Ley ve Low 1989).

Ultrasonik dalgaların temelini, darbe-yansıma (pulse-echo) prensibi oluşturmaktadır. Yani bir dalga darbesi gönderilir ve hedeften yansiyarak gelen eko geri alınır. Geri alınan ekodan, gözle görülmeyen hedefle ilgili istenen bilgiler elde edilebilmektedir. Bu sistemi kullanan canlılar içerisinde en çok bilinenleri yarasalar ve yunus balıklarıdır. Bu canlılar örnek alınarak geliştirilen ve daha çok askeri amaçlı olarak kullanılan cihazlar sonar ve radarlardır. Sonar ve radarlarda amaç; gözle görülmeyen nesnelere belirlemek, sınıflandırmak ve izlemektir.

1.4. Hız, Dalga Boyu, Frekans

Ses dalgalarının tekrarlanan seri basınç dalgalarından meydana geldiği ve yayıldığı, ortamlardaki molekülleri titreştirerek ilerlediği bilinmektedir (Şekil 1.1) (Halliday ve Resnick 1992).



Şekil 1.1. Ses dalgasının genliği, dalga boyu, periyot (Halliday 1992).

Bütün ses ve elektromanyetik dalgalar; $V= F/\lambda$ eşitliğine uygun olarak yayılmaktadırlar. Burada; V: Hız (metre/saniye), F: Frekans (hertz, siklus/saniye) ve λ : Dalga boyu (milimetre)'nu ifade eder. Denklemine göre frekans artınca sesin dalga boyu kısalmaktadır.

Ses dalgasının güç veya şiddeti amplitude/genlik olarak ifade edilir ve ses sisteminde sesin gücü (volume) veya ses yüksekliği (loudness) ile aynıdır. Yoğunluk ise ses dalgasının yayılması ile ilişkili birim alan boyunca enerji akım oranını ifade eder ve parçacıkların (partikül) titreşim oranını da kapsar. Genlik ve yoğunluk birbirleriyle doğrudan ilişkilidir.

Dalga boyu; verilen dalgalar üzerinde iki benzer nokta arasındaki mesafedir. Bir siklus esnasında katedilen mesafe olarak da tanımlanabilir. Frekans; verilen zaman periyodu içerisinde (birim zaman içinde/genellikle 1 saniye) dalga veya siklus/titreşim sayısıdır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Ultrason frekansları ve dalga boyları (Dinç 2008).

| | |
|----------|----------|
| 1.0 MHz | 1.54 mm |
| 2.0 MHz | 0.77 mm |
| 2.25 MHz | 0.68 mm |
| 3.0 MHz | 0.51 mm |
| 5.0 MHz | 0.31 mm |
| 7.5 MHz | 0.21 mm |
| 10.0 MHz | 0.15 mm |
| 15.0 MHz | 0.103 mm |

Frekans, Gustaf Ludwing Hertz (1887-1975) anısına Hertz olarak kabul edilmiştir. Hız; verilen bir noktadan bir dalga boyunun geçmesi için gerekli zamandır. Hız, dokunun yoğunluğu, elastikiyeti ve ısısına bağlıdır (Dinç 2008). Aradaki ilişki ters orantılı olduğu için yumuşak dokuda ses frekansı 1,5 MHzden 3 MHz çıkınca dalga boyu da 1mm den 0,5mm ye düşer. Ses dalgalarının yayılma hızını; ortamın cinsi, yoğunluğu, ısısı ve diğer bazı faktörler belirlemektedir. Ortam ne kadar yoğun ise yayılma hızı o kadar artmaktadır (Çizelge 1.2).

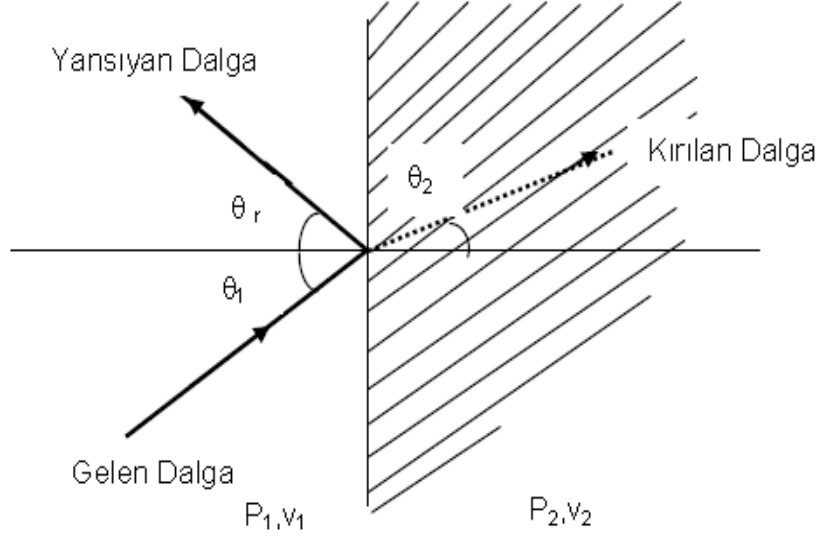
Çizelge 1.2. Sesin Çeşitli Dokulardaki Hızı (m/sn) (Dinç 2008).

| | |
|--------------|-------------|
| Hava | 331 |
| Su | 1.525 |
| Distile su | 1.530 |
| Kemik | 3.360-4.080 |
| Yağ | 1.450 |
| Kan | 1.570 |
| Kas | 1.585 |
| Böbrek | 1.561 |
| Lens | 1.640 |
| Yumuşak doku | 1.540 |

Ses şiddeti Watt/cm² birimi ile ölçülür. Pratikte ise ses şiddeti Bel ile ölçülür (1B=10dB). Elektromanyetik dönüştürücü vasıtasıyla ses oluşturma ilkesini ilk bulan Aleksander Graham Bell'den adını almıştır. Ultrasonda da ses demetinin şiddeti/yoğunluğu (amplitude) genellikle (dB) (0,1 bel) ile ölçülür. İşitme eşiğindeki sesin şiddeti 0 dB' dir. Desibel, ses şiddetini gösteren birimin onda biridir ve bir ses yoğunluğunun diğeri ile karşılaştırılmasıdır. Desibel daima iki değer arasındaki karşılaştırmadır (Dinç 2008).

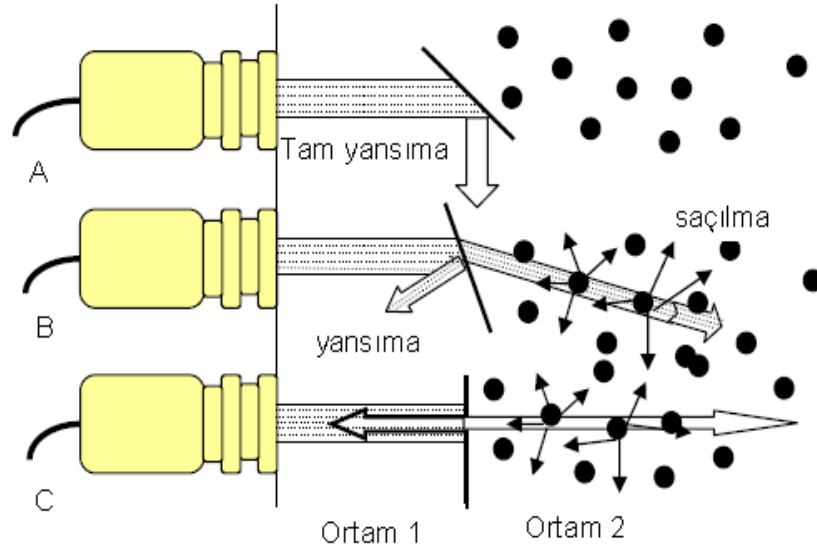
1.5. Yansıma, Saçılma, Kırılma ve Zayıflama

Optikteki ışığın yansıması ve kırılması ile ilgili kurallar akustik için de geçerlidir. Şekil 1.2' de gelen dalganın farklı bir fiziksel ortama girdiğinde bir kısmının yansıması ve kırılması gösterilmiştir.



Şekil 1. 2. İki farklı ortam yüzeyinde yansıma ve kırılma (Suslick 1988).

Ultrasonik dalgaların yansıması-kırılması, düzgün ve geniş yüzeylerde söz konusudur. Ancak ortamlar içinde homojen olmayan ve farklı yoğunlukta bölgeler bulunmaktadır. Dalga demeti bu tür ortamlara çarptığında saçılmaya uğrar ve yön değiştirir (Şekil 1. 3) .



Şekil 1. 3. Ultrasonik dalgaların yansıması, kırılması ve saçılması (Suslick 1988).

- A. Geliş açısı kritik açıdan büyükse gelen ışın demeti yansıtılır.
- B. Gelen ışınının bir kısmı yansıtılır, kalanı kırılır ve yoluna devam eder. Geçen ışın demeti kısmen saçılır.
- C. Işın demeti yüzeye dik olarak gelirse, yansıyan ışınların çoğu dönüştürücüye (transducer), işaret güçlendirici olarak geri döner.

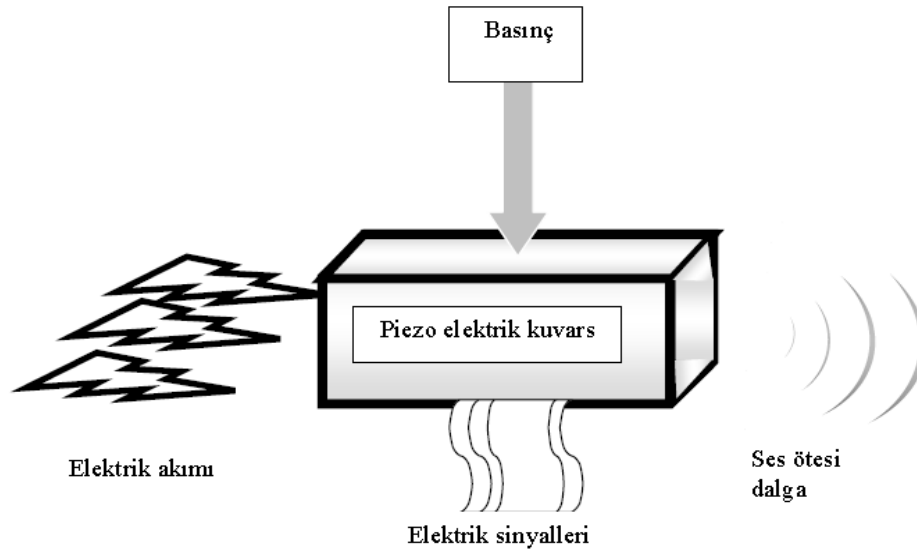
Ultrasonik dalga demeti farklı ortamlardan geçerken gücünde bir azalma yani zayıflama olmaktadır. Ses dalgalarının yoğunluğunun azalmasına, enerjisinin bir kısmını kaybederek zayıflamasına yol açan üç temel etken ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi absorpsiyondur. Farklı ortamlardan geçerken ultrasonik dalgaların enerjisinin bir kısmı, ortamdaki moleküllerin uyarılmasında (son yörüngedeki elektronlar enerji alarak bir üst enerji seviyesine çıkarlar) kullanılır, uyarılan moleküller tekrar uyarım öncesi hale dönerken aldıkları enerjiyi ısı enerjisi olarak ortama verirler. Zayıflamaya yol açan ikinci etmen saçılmadır. Saçılma sonucunda birim alandan geçen enerji miktarı azalmaktadır (Halliday ve Resnick 1992). Saçılma sisteki otomobil farının parlamasıyla aynıdır. Far hüzmesi ışığın tüm yönlere dağılması nedeniyle hızla zayıflar (Dinç 2008). Zayıflamaya neden olan üçüncü faktör ise, dalga demetinin belirli bir mesafeden sonra genişleyerek yayılmasıdır. Enerji yoğunluğu kesit alanla ters orantılıdır. Demet genişlediğinde kesit alan artacağından dokudan geçen enerji yoğunluğu azalmaktadır. Ultrasonik dalga demetinin zayıflaması, ortamın türü, kalınlığı ve dalganın frekansına bağlıdır (Halliday ve Resnick 1992). Bu zayıflama her MHz için, santimetrede 1 desibel (dB)'dir. 5 MHz ' lik bir ses dalgası 4 cm'de 40 dB zayıflar. Frekans yükseldikçe zayıflama arttığı için penetrasyon azalır (Dinç 2008).

1.6. Ultrasonik Dalga Üretimi

1912 yılından itibaren, ses dalgalarıyla buz dağlarını saptamak için çalışmalar yapıldı. Bu çalışmalarda, karanlıkta veya sisli havalarda görülemeyen büyük nesnelere varlığını belirlemek için, sesin bir yere çarpıp geri dönme özelliğinden yararlanılıyordu. Patlama sesleri ve başka yüksek sesler kullanılarak yapılan ilk deneylerde pek başarı elde edilemedi. Bunun ana nedeni yansıyan sesin çok zayıf olması ve bir gemide epey yüksek olan sürekli gürültüden kolayca ayırt edilememesiydi. 1917 yılında Fransız fizikçi Langevin, frekansı işitme eşiğinin üzerinde olan bir ses kullanmanın daha iyi olacağını fark etti. Böyle bir ses, geminin

motorlarından kaynaklanan parazitlerden ve denizdeki çeşitli gürültülerden etkilenmeyecekti. Bu sebeple kuvars kristalini kullanmaya karar verdi. Uygun şekilde kesilmiş bir kuvars parçası piezoelektrik özellik gösterir. Kristale belli bir doğrultuda basınç uygulandığında, buna dik bir doğrultuda bir elektrik sinyali oluşur. Bunun tersi de geçerlidir, kristale alternatif bir gerilim uygulandığında kristal titreşmeye başlar. Kristalin büyüklüğü, doğal titreşim frekansı uygulanan elektrik sinyalinin frekansına eşit olacak şekilde ayarlanırsa, titreşimler çok büyük olabilir ve yoğun bir ses dalgası veya ultrasonik dalga üretilir. Günümüzde kuvars ve benzeri birkaç madde (Kuvartz, Lityum sülfat, Rochelle tuzu) ultrasonik ses üretmek için kullanılmaktadır (Şekil 1.4). Benzer özelliklere sahip bir kristal, ultrasonik bir ses dalgasıyla elektrik sinyali üreten hassas bir mikrofon olarak da kullanılabilir (Cordemans 1991).

1.7. Piezoelektrik Etki



Şekil 1. 4. Ultrasonik dalgaların piezoelektrik madde ile oluşturulması (Halliday ve Resnick 1992).

Ultrason dalgaları, içerisine piezoelektrik kristalleri yerleştirilmiş transdüserler tarafından oluşturulur. Dokulara gönderilen ses dalgalarının bir kısmı geri yansyarak tekrar kristallere çarpmakta ve elektrik akımına dönüştürülmektedir. Elektrik enerjisinin sese dönüşümü ve ses enerjisinin elektriğe dönüşümüne piezoelektrik olay adı verilir. Ultrasonun elde edilmesinde temel ilke piezoelektrik olaydır. Piezo terimi Yunanca' dan köken almıştır ve basınç anlamındadır.

Piezoelektrik terimi bugün basınç elektriği anlamında kullanılmaktadır. Kuvartz, Lityum sülfat ve Rochelle tuzu (sodyum potasyum tartarat) gibi doğal tuzlar veya Baryum titanat ($BaTiO_3$), Kurşun metabionat ($PbNb_2O_6$) ve Kurşun zirkonat titanat (PZT) yüksek basınca maruz kaldıklarında elektrik akımı üretirler. Buna piezoelektrik etki denir.

Bu kimyasal maddelere yüksek frekanslı elektrik akımı yüklendiğinde, mekanik titreşimlerin oluşmasına da ters piezoelektrik etki adı verilir. İlk piezoelektrik kristaller kuvars temellidir. Kuvarsın iyi piezoelektrik özelliğinin yanı sıra kırılkan bir malzeme olması cihazlarda kullanılmasını sınırlamıştır. Turmalin kristalleri kuvarstan sonra piezoelektrik özelliğe sahip olan nadir minerallerdendir. Günümüzde üretilen problemlerin çoğunda PZT (Kurşun Zirkonat Titanat) kristali; polarize edilmiş seramik kristal kullanılmaktadır. Bütün piezoelektrik problemler seramikten yapılır (Şendağ 2002, Dinç 2008,).

1. 8. Ultrasonik Dalgaların Kullanım Alanları

Mühendislik: Delme, öğütme ve kesme işlemlerine yardımcı olarak. Özellikle cam, seramik gibi sert ve kırılkan malzemelerin işlenmesinde kullanılır.

Jeografi ve Jeoloji: Deniz ve okyanus diplerindeki mineral ve petrol rezervlerinin tespitinde kullanılır.

Endüstri: Pigmentlerin ve katıların, boya, mürekkep ve reçinelerin içerisinde kolay dağılmalarını sağlar. Ultrasonik banyo da mühendislik malzemelerinin temizlenmesinde kullanılır.

Kimya: Ses hızındaki değişimin değerlendirilmesiyle; reaksiyon gelişiminin gözlenmesinde, kalite kontrol, konformasyonel enerji değişimlerinin hesaplanmasında kullanılır. Puls/Eko tekniğinin kullanıldığı yerler; tekneler içindeki malzemenin hacminin ölçülmesi, heterojen ara fazına olan uzaklığın ölçülmesi, biyomoleküllerin şekillerinin sınıflandırılabilmesi için farklı frekanslardaki sesin absorblanmasındaki değişikliklerde yararlanılarak kullanılmaktadır.

Diş Hekimliği: Dişlerin oyulmasında ve temizlenmesinde kullanılır.

Tıp: Teşhis ve tedavi amacıyla kullanılır. Ultrasonik enerjiyle 2-10 MHz arasında yapılır.

Plastikler ve Polimerler: Güçlü ultrasonik enerjinin kullanılması ile, termoplastiklere uygulanan kaynak işlemleri kolaylıkla yapılabilir. Polimerizasyon başlatılması ve polimerin bozunumu etkileri için kullanılır.

Biyoloji ve Biyokimya: Hücre içerikleriyle ilgili çalışmalarda membran bütünlüğünün bozulmasında kullanılır.

1.9. Ultrasonik Dalgaların Kimyasal Tepkimeler Üzerine Etkileri

Ultrasonik dalgaların kullanıldığı tepkimelere Sonokimyasal tepkimeler denmektedir. Sonokimya ‘ultrasonik dalgalar’ yoluyla kimyasal tepkimenin gerçekleştiği koşulların iyileştirilmesini, tepkime mekanizmasının değiştirilmesini ve tepkimeyi hızlandıracak radikal oluşumunu arttırmayı amaçlamaktadır. Ultrasonik dalgaların kimyasal tepkimelere etkileri;

-Tepkime hızını artırır.

-Serbest radikal oluşumunu sağlayarak başlatıcı veya katalizör olarak görev yapar.

-Mekanik etkileri sayesinde yüzey alanını artırarak, kütle aktarımını hızlandırır.

-Yan ürünlerin oluşmasını engeller.

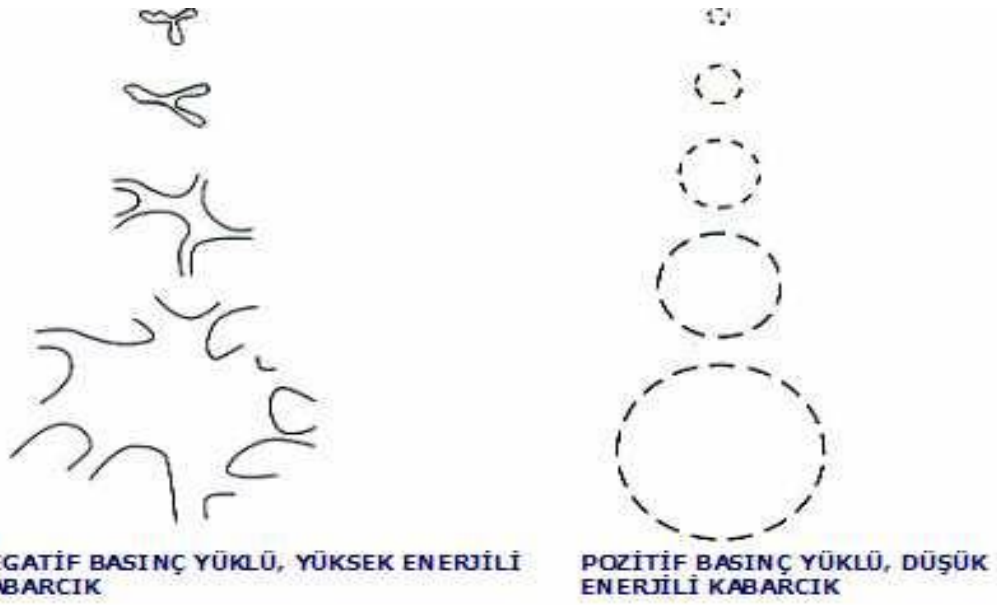
-Tepkimenin verimini arttırmakla birlikte tepkime süresini kısaltır (Suslick 1988, Thompson ve Doraiswamy 1999, Adewuyi 2001).

1. 10. Kavitasyon

Ultrasonik enerjinin kimyasal gücü, kavitasyon olayı ile ortaya çıkmaktadır. Kavitasyon, negatif basınç uygulanan sıvıda mikrobaloncukların oluşması olayıdır. Bu baloncuklar birbirleri ile sürekli olarak çarpışarak büyümekte, böylece kuvvetli bir lokal enerji ortaya çıkmaktadır (bilesim.com.tr 2008).

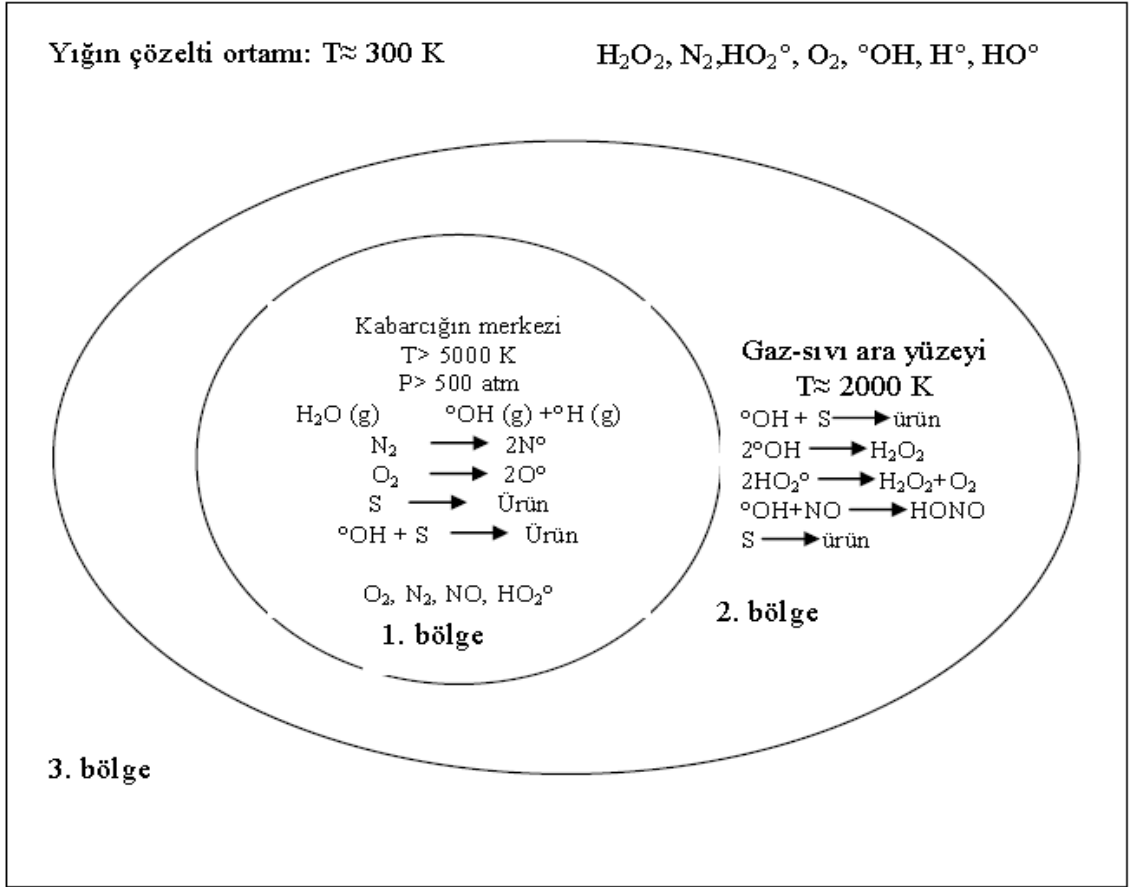
Ultrasonik dalgaların kimyasal ve mekanik etkileri, kavitasyon kabarcıkları tarafından meydana gelmektedir. Kavitasyon kabarcıklarının genleşme sırasında büyümeleri için geçen süre, büzüşme sırasındaki daralmalarına göre daha fazladır (Şekil 1.5). Bu durum sıvı fazda oluşan kabarcıkların gaz ya da buhar olarak eşit olmayan dağılımına bağlıdır. Sıvıda yer alan bu kabarcıklar içinde yüksek sıcaklık ve basınç meydana gelmektedir (Suslick 1988).

Bütün ses dalgaları gibi, ultrasonik ses dalgaları da sıvı içinde dalgalar halinde iletilmektedir. Ses dalgaları içinden geçtiği ortamın, moleküler yapısında daralma ve genişlemeye yol açar. Eğer yeterli miktarda negatif basınç sıvıya uygulanırsa, sıvı bütünlüğünü sağlamak için gerekli olan kritik mesafe aşılacaktır. Sıvıda boşluklar oluşacak ve parçalanma (yarılma) meydana gelecektir. Bu boşluklara "kavitasyon baloncukları" adı verilir (bilesim.com.tr 2008).



Şekil 1. 5. Kavitasyon kabarcığın oluşum mekanizması (Cordemans 1991).

Ultrasonik dalgaların kavitasyonel etkilerinin sadece tek bir kabarcıkla değil; kabarcık yığını içerisindeki kavitasyonel olaylarla da ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Şekil 1. 6).



Şekil 1. 6. Bir kavitasyon kabarcığı üzerinde sonokimyasal tepkimelerin olduğu bölgeler (Adewuyi 2001).

1. Bölge (Gaz Bölge) : Buharlaşmış tepkime karışımı ve gazlar bulunur. Bu bölgedeki sıcaklık ve basınç değerleri yüksektir. Aynı zamanda bu bölgede çok reaktif radikaller oluşur, oluşan serbest radikaller ya kendi aralarında tepkimeye girerler ya da sıvı bölgeye geçerler.

2. Bölge (Ara Bölge) : Daha az uçucu olan reaktanları içerir.

3. Bölge (Yığın Çözelti ortamı) : Sadece sıvıdan oluşur.

1. 10.1. Kavitasyonu Etkileyen Faktörler

Kavitasyon oluşumu reaksiyonlarını etkileyen başlıca faktörler; frekans, çözücü viskozitesi, çözeltinin yüzey gerilimi, çözeltinin buhar basıncı, sıcaklık, gaz baloncukları, uygulanan dış basınç, sonikasyon yoğunluğu ve sesin zayıflamasıdır.

Frekans: Kavitasyon oluşumunda frekans önemlidir. Genel olarak sonokimya da 20-40 KHz 'lik ses dalgaları uygulanmaktadır. Daha yüksek frekanstaki dalgalar (MHz) sıvılarda kavitasyon oluşumunu azaltacaktır. Bu olay frekans artışıyla genleşme döngüsünün oldukça kısılmasıyla açıklanmaktadır. Moleküllerin

birbirlerinden yeterince uzaklaşıp baloncunun oluşmasına imkan sağlayacak genişleme döngüsü için yeterli süre sağlanamaz.

Çözücü Viskozitesi: Kaviteyasyon eldesi, genişleme bölgesindeki negatif basıncın, sıvı içindeki doğal kohezyon kuvvetlerine üstün gelmesini gerekli kılmaktadır. Bu yüzden böyle kuvvetlerin büyük olduğu viskoz sıvılarda kaviteyasyonun elde edilmesi daha zor olacaktır.

Çözeltinin Yüzey Gerilimi: Yüzey gerilimi düşük sıvılar kullanıldığında, kaviteyasyonun başlatılmasında bir azalma olacağı beklenebilir. Bu durum basit bir bağıntı değildir, fakat sulu çözeltiler söz konusu olduğunda, yüzey-aktif bir maddenin katılımı yardımcı olmaktadır.

Çözeltinin Buhar Basıncı: Düşük buhar basıncına sahip olan bir çözücünde kaviteyasyonu başlatmak daha zordur. Kaviteyasyonun kolaylıkla oluşturulabilmesi için çözücünün daha uçucu olması gereklidir. Bu durumda ise, daha fazla buharın baloncuklar içine girmesi söz konusudur ve bu nedenle çarpışmadaki şiddet azalmaktadır (Öner 2002).

Sıcaklık: Sıcaklık, genellikle sonokimyasal reaksiyonların hızını azaltmaktadır. Bu azalış bir dizi olayın sonucunda gerçekleşmektedir. Tepkime sıcaklığının artması denge buhar basıncını arttırmaktadır. Böylece daha çok kabarcık oluşumu gerçekleşmektedir. Ancak bu durum kaviteyasyonel kabarcığın daha fazla buhar içermesi anlamına da gelmektedir ki buhar ultrasonik eriyiğın gücünü azaltmaktadır (Thompson ve Doraiswamy 1999). Kabarcıkların en büyük yarıçapından en küçük yarıçapına doğru büzülüşünde içindeki gazın sıcaklığı 100 Kelvin' e ulaşabilmekte ve basıncı oldukça yüksek değerlere çıkabilmektedir (Kavutçu 2006). Sonuç olarak sonokimyasal tepkimeler en iyi düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Basınç artışı ise sonokimyasal etki ile doğru orantılıdır. Çünkü kaviteyasyon sırasında oluşan ultrasonik enerji artmaktadır. Kaviteyasyon yoğunluğu yüksek viskoziteli sıvılarda daha yüksektir (Thompson ve Doraiswamy 1999).

Gaz Baloncukları: Ultrasonik enerji, bir sıvı içindeki gazın atılması için de kullanılmaktadır. Böylece sonikasyonda, kaviteyasyon relatif olarak daha kolay oluşacaktır. Fakat gaz uzaklaştırıldıkça kaviteyasyonun oluşturulması güçleşecektir.

Üniform bir kavitasyonun oluşturulabilmesi için sonokimyasal bir reaksiyonun içinden gaz baloncukları geçirilebilir.

Uygulanan Dış Basınç: Dış basıncın artırılması, kavitasyonun başlatılması için gerekli enerjiyi artırırken, sonokimyasal etkinin de yükselmesine yol açar.

Sonikasyon Yoğunluğu: Sonikasyonun şiddeti, direkt olarak ultrasonik kaynağın vibrasyon genliğiyle bağıntılıdır. Genel olarak, şiddetteki bir artış, sonokimyasal etkide de bir artışa yol açacaktır. Sisteme giren ultrasonik enerji üç nedenden dolayı kesin olarak artırılmamaktadır. Bu nedenler şunlardır:

-Sonikatörde kullanılan transduserin boyut değişiminin artırılması, malzemeyi çatlatarak bozulmaya neden olacaktır.

-Yüksek vibrasyonel genlikte ultrasonik enerji kaynağı, tam bir çevrim boyunca sıvı ile temasa giremeyecektir. Bu durum teknik olarak “Yeniden Birleşme” olarak bilinmektedir ve enerji kaynağından ortama gücün transferinde büyük bir verim kaybına sebep olmaktadır.

- Büyük miktardaki ultrasonik güç sisteme uygulandığında, çözelti içinde çok fazla sayıda kavitasyon baloncuğu oluşmaktadır. Bu baloncukların büyük bir çoğunluğu birleşecek ve daha kararlı baloncuklar oluşturacaklardır. Bunlar sıvı içinde ses enerjisinin geçişini yavaşlatabilecek ve sonokimyasal etkiyi vermek üzere çarpışacak olan daha küçük baloncukların çoğunu uzaklaştırabileceklerdir.

Sesin Zayıflaması: Ultrasonik ses dalgaları ortamdaki geçerken çeşitli nedenlerden dolayı şiddeti azalır. Bu enerjinin bir kısmı ısı şekline dönüşür. Sesin zayıflama derecesi, frekansla ters orantılıdır. 118 KHz'deki sesin şiddeti 1 000 m uzunluğundaki su kütlesi içinden geçirilmesiyle yarıya inmektedir. 20 KHz'lik sesin şiddetinin yarıya indirilmesi için gerekli mesafe ise çok daha fazladır ve yaklaşık 90 000 m kadardır. Bu hesaplamalar belirli bir mesafede aynı şiddetlerin elde edilebilmesi için, daha yüksek başlangıç gücünün kullanımının gerekli olacağını açıkça göstermektedir (Öner 2002).

1. 11. Sonokimyasal Tepkime Teorileri

Sonokimyasal tepkimeler, sisteme ultrasonik dalgalar verilerek gerçekleştirilen tepkimelerdir. Ultrasonik dalgaların kimyasal tepkimeler üzerindeki etkileri fiziksel ve kimyasal etkiler olmak üzere iki şekilde açıklanmaktadır.

Ultrasonik dalgaların fiziksel etkileri katalizörün aktifliğini artırarak tepkimenin yürüyüşünü daha verimli hale getirmektedir. Ultrasonik dalgaların kimyasal etkileri ise, kavitasyon sırasında serbest radikal oluşumu nedeniyle tepkime hızının artması şeklinde açıklanmaktadır (Adewuyi 2001).

Ultrasonik dalgalar sıvı fazlı homojen sistemlerde kavitasyon olayını meydana getirerek akustik mikroakım veya çok küçük şekildeki girdaplara neden olmakta, böylece yığın çözeltinin kütle ve ısı aktarımını artırmakta ve hız gradyeni oluşturarak kesme gerilimiyle sonuçlanmaktadır. Heterojen sistemlerde ise kavitasyonun mekanik etkileri görülmektedir. Kabarcık ile yığın çözelti ara yüzeyinde kabarcıkların asimetrik parçalanmasını sağlayarak, mikrojet şeklinde erozyon oluşturmaktadır.

Sonokimyasal reaksiyonları açıklamada 4 teori ileri sürülmektedir. Bu teoriler; (1) Sıcak-nokta teorisi (2) Elektrik alan teorisi (3) Plazma yük dağılımı teorisi ve (4) Süperkritik teori şeklinde sıralanabilir. Bunlar prolitik bozunma, hidroksil radikal oksidasyonu, plazma kimyası ve süperkritik su oksidasyonu gibi bazı aktivitelerin oluştuğunu öne sürmektedir.

Sıcak-nokta teorisi: Bu teoriye göre, oluşan kabarcıkların şiddetle parçalanması esnasında lokal olarak basınç 1000 atmosfer üzerinde ve sıcaklık yaklaşık 5000 K olmaktadır (Adewuyi 2001). Teorik hesaplamalar, su içinde kavitasyonu oluşturmak için, oldukça yüksek bir enerjiye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Eğer saf su için kritik mesafenin 8-10 cm olduğu düşünülürse, gerekli negatif basınç 10,000 atmosferlik bir mertebede olacaktır. Baloncukların, suyun buharlaşmasından meydana gelen buhar ile dolduğu düşünülerek bu hesaplama yapılırsa, kavitasyonu oluşturmak için yaklaşık 1000 atmosferlik bir negatif basınç gerekli olacaktır. Pratikte kavitasyon olayı, sıvının içinde dayanıklılığını zayıflatacak merkezler bulunmasından dolayı uygulanan daha düşük akustik basınçlarla meydana getirilebilir. Sıvı içinde zayıf noktaların bulunması, (sıvı içinde gaz bulunmasından) asılı duran çok az miktardaki gaz baloncuklarından veya asılı durumdaki partiküllerden dolayı olmaktadır. Ultrafiltrasyon uygulanmamış tüm sıvıların içinde küçük parçacıklar bulunmaktadır (Öner 2002).

Elektrik alan teorisi: Sınırlı koşullarda yoğun elektrik alan yüzünden parçalanma ile ekstrem koşullar meydana gelmektedir. Kabarcık oluşumu ve parçalanması esnasında ciddi bir elektrik alan gradyeni oluşmaktadır. Bunlar bağların kırılmasını ve kimyasal aktivitenin artmasını sağlamaktadır.

Plazma teorisi: Elektrik alan teorisinde olduğu gibi yoğun elektriksel alanından dolayı ekstrem koşullar meydana gelmekte ve gerçek bir iç patlamanın gerçekleşmediği vurgulanmaktadır. Kavitasyon kimyasının esası parçalanmış, bir parçalanma prosesi ile oluşan korona-tipi akıma benzetilmektedir. Sonokimya ile korona kimyası arasında pek çok benzerlik olması bu fikri desteklemekte ve kabarcıklar içinde mikroplazmaların oluşması bu görüşleri desteklemektedir.

Süperkritik teori: Kabarcık-çözelti ara yüzeyinde bir tabakanın var olduğu ileri sürülmektedir. Burada sıcaklık ve basınç suyun kritik koşullarının üstünde olabilir. Sonolitik olarak oluşan kavitasyon kabarcıklarının parçalanması sırasında süperkritik su elde edilmektedir (Adewuyi 2001).

1. 12. Ultrasonik Homojenizasyon

Günümüzde hücreleri parçalamak için yaygın olarak kullanılan metodlardan bir tanesi de ultrasonik homojenizasyondur. Bu sistemde homojenizatör sıvıda yoğun sonik basınç dalgaları oluşturur. Basınç dalgaları sıvıdaki mikrobaloncukların birleşerek hızla büyüyen, maksimal büyüklüğe ulaşmasına, sonuçta hızla kollapse olmasıyla karışımına sebep olur. Bu olay kavitasyon olarak adlandırılır Kavitasyon oluşumunda öncelikli olarak moleküller arası van der wals bağlarının ve daha ileri aşamada da kovalent bağların kopması için yeterli enerji açığa çıkabilir (nirosoavi.com.tr 2009). Hücre parçalanmasının etkileyen faktörler;

- Uygulama süresi ve yoğunluk,
- Hücre konsantrasyonu,
- Basınç,
- Kanal kapasitesi ve şeklidir.

Modern ultrasonik işlemciler, kurşun zirkonat titanat kristallerinden yapılmış piezoelektrik çeviricileri kullanmaktadırlar. İşlem esnasında ultrasonikatör önemli ölçüde ısı üretmektedir ve dışardan soğutucuya ihtiyaç duyulmaktadır. Süspansiyon

ısısı mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır. Düşük sıcaklık ve yüksek yoğunluk şok artışına yol açar. Yani ultrasonik sıvının ısısı onun donma noktasından yukarıda tutulmalıdır. Yeterli büyüklükte (0,05-0,5 mm) baloncukların oluşması ve baloncukların birleşmesiyle ortaya çıkan enerji yüklemesi, hücre parçalanmasını hızlandırmaktadır. Baloncuklar, hücredeki spor ve mayaların parçalanması için gereklidir. Deri ve kas gibi sert dokular, ultrasonik işlemde önce daha küçük parçalara ayrılmalıdır. Köpük oluşumunu engelleyici veya yüzey gerilimini düşürücü materyalleri kullanılmamalıdır. Sonikasyonda oluşan serbest radikallerin zararlarının engellenmesi amacıyla, homojenizasyon ortamına cistein, dithioeritrol benzeri antioksidanlar konulmalıdır (nirosoavi.com.tr 2009).

Bütün organik sıvılarda ultrasonik ısınmayla serbest radikaller açığa çıkar. Serbest radikaller çok reaktif molekül olmalarından dolayı anselektif (seçici olmadan) tepkimeye girer, lipit peroksidasyonu ile hücre membran yapısını bozarak, biyolojik yapılara zarar verebilir. Protein yapısındaki biyomoleküllerin, fonksiyonlarını etkiler, ayrıca DNA üzerindeki etkileriyle somatik ve genetik değişikliklere yol açar (Karabiga ve ark 2007). Biyolojik sistemlerde, serbest radikallerden en önemlileri; süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH) radikalleridir. Süperoksit radikali, normal hücre metabolizmasında, mitokondrial, endoplazmik retiküler ve nükleer membran elektron transport işlemleri esnasında oluşan bir ara üründür. Süperoksit radikalinden, SOD (süperoksit dismutaz) enziminin katalizlediği bir reaksiyonla H_2O_2 oluşur. SOD, CAT ve glutasyon peroksidaz, serbest oksijen radikallerine karşı önemli hücre içi enzimatik savunma sistemleridir. Serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan lipit peroksidasyonu, hücre membran hasarının önemli bir nedenidir (Kiriş ve ark 2005).

1.13. Serberst Radikaller ve Antioksidan Sistemler

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve etkin moleküller olarak tanımlanır (Mercan 2004). Eşlenmemiş tek elektron serbest radikallere karakteristik kimyasal özellikler kazandırır (Akpoyraz ve Durak 1995). Mn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de eşlenmemiş elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler ancak serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş 1995). Nitrik oksit (NO), (NO₂) Nitrik dioksit gibi bileşiklerde radikal yapısındadır. Serbest

radikallerin, eşlenmemiş elektronlara bağlı olarak reaktiveleri yüksektir ve bu nedenle de diğer moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişinde bulunurlar (Akpoyraz ve Durak 1995, Gürbüz 2008). Bir molekülün serbest radikal olduğunu göstermek için üzerine nokta konur (O^{\bullet} , O_2^{\bullet} gibi). Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (Akkuş 1995).

Serbest radikaller, moleküllerden elektron alarak daha kararlı hale gelmeye çalışırlar ve böylece binlerce reaksiyon gelişebilir. Serbest radikaller yaşam için gereklidir, enerji üretimi, elektron transferi ve diğer metabolik işlevlerde temeli oluşturur. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Akkuş 1995).

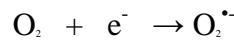
'O' içeren serbest radikal "reaktif oksijen ürünü (ROS)" olarak adlandırılır. Oksijen içeren serbest radikallerin elektronların iki tanesi eşlenmemiştir, bu yüzden oksijen bazen "diradikal" olarak değerlendirilebilir (Akkuş 1995).

1.13.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

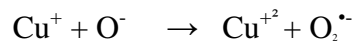
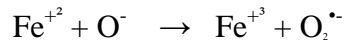
En çok görülen reaktif oksijen türleri, süperoksit radikali (O_2^{\bullet}), singlet oksijen (O^{\bullet}), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2).

Süperoksit Radikalı (O_2^{\bullet})

Süperoksit radikali (O_2^{\bullet}), aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur.



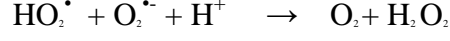
Geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit radikali meydana getirebilir (Akkuş 1995).



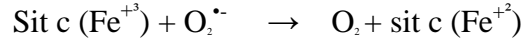
Süperoksit radikali bir serbest radikal olmakla birlikte hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgemesi bakımından önemlidir (Akkuş 1995). Düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali (HO_2^{\bullet}) oluşturmak üzere protonlanır (Aalt 1991).



Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



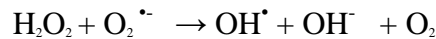
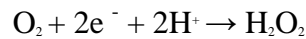
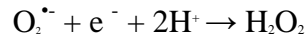
Süperoksit radikali, hem oksitleyici hem redükleyici özelliğe sahiptir. Redüktan olarak görev yaptığında, ferrisitokrom c'nin ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.



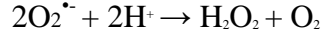
Oksidan olarak görev yaptığında, epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir. Süperoksit radikali, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^\bullet) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^\bullet), nitronyum iyonu (NO_2^+), hidroksil radikali (OH^\bullet) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^\bullet) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur. Peroksinitritin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır (Gürbüz 2008).

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin iki elektron veya süperoksidin bir elektron alması sonucu oluşan hidrojen peroksit, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline kolayca yıkılır. H_2O_2 membranlardan geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır.



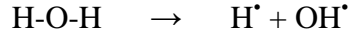
Hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde süperoksit dismutaz (SOD) katalizörlüğünde veya süperoksidin dismutasyonu ile spontan olarak gelişir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir.



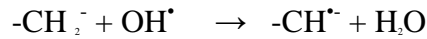
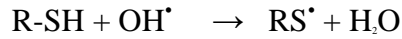
Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri (ROS) içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Geçiş metallerinin varlığında ‘Fenton reaksiyonu’ sonucu, süperoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) varlığında ‘Haber- weiss’ reaksiyonu sonucu en reaktif, zarar veren hidroksil radikali (OH^{\cdot}) oluşur. Hidrojen peroksit süperoksit gibi hem oksitleyici hem redükleyici özelliğe sahiptir (Akkuş 1995).

Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

Hidroksil radikali (OH^{\cdot}), hidrojen peroksitten (Fenton reaksiyonu ve Haber-weiss reaksiyonu sonucu) oluşmaktadır. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sunucunda da hidroksil radikali oluşur.



Hidroksil radikali, son derece reaktif bir oksidan radikalidir, yarılanma ömrü kısa ve reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak karbon merkezli organik radikaller (R^{\cdot}), tiyil radikalleri (RS^{\cdot}) gibi yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Akkuş 1995).



Singlet oksijen (O^{\cdot})

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için, radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur (Akkuş 1995).

Oksijenin eşlenmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale kendi spinin ters yönünde yer değiştirmesiyle oluşur. Doymamış yağ asitleriyle doğrudan tepkimeye girerek peroksi (ROO^{\cdot}) radikalini meydana getirir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Barber ve Haris 1994).

1.13.2. Serbest Oksijen Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin oluşumu, yangı, yaşlanma, radyasyon, yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2^*), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar (Altınışık 2009).

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Akkuş 1995). Hidroksil radikali (OH^*) ve süperoksit radikali (O_2^*) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar.

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucunda hücre hasarı olur.

Serbest radikallerin lipidlere etkileri

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda serbest radikal olduğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995).

Lipid peroksidasyonu, oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Oluşan lipid radikali dayanıksızdır ve bazı değişikliklere uğrar. Çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları, lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşimi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer poliasantüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Araşidonik asit metabolizması

sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna “enzimatik lipit peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipit peroksidasyonu” denir (Gürbüz 2008). Lipit peroksidasyonu oluşan lipit hidroperoksitlerin yıkımı, iyon katalizini gerektirir. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında, aktif olan aldehitler oluşurlar. Bu bileşikler hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehid (MDA) oluşur. Bu durum lipit peroksit seviyesinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır.

Lipit peroksidasyonu zararlı bir reaksiyondur ve direkt membran yapısına, dolaylı olarak aldehidler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına sebep olur (Akkuş 1995).

Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliasantüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar ve zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki ile özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur (Akkuş 1995).

Reaksiyonlar sonucu, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (Ig G) ve albumin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin, süperoksit radikali, reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hem proteinleri de (hemoglobin) serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^{\cdot}) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde de değişiklik meydana gelebilir (Stadtman 1993).

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler

oluşabilir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Akkuş 1995).

Serbest radikallerin nükleik asitler ve DNA' ya etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA' yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH^{*}) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H₂O₂) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside (O₂^{*}) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozus (SLE) ve romatoid artrit (RA) dolaşımında anti-DNA antikorlar bulunur (Akkuş 1995).

1.13.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne antioksidanlar denir (Tekkes 2006).

Antioksidanlar etkilerini dört ayrı şekilde gösterirler;

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.
2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seroplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek, reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilirdiği gibi, serbest

radikalin oluşumunu önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler (Akkuş 1995).

Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar şeklinde (Çizelge 1.3) iki gruba ayrılır (Akkuş 1995).

Çizelge 1.3. Enzim ve enzim olmayan antioksidanlar (Akkuş 1995).

| <i>Enzimatik</i> | <i>Nonenzimatik</i> | |
|--|---|--|
| Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (CAT) Glutasyon peroksidaz (GPx) Glutasyon redüktaz (GSSS-R) Glutasyon S-transferaz (GST) Mitokondriyal sitokrom oksidaz | Glutasyon (GSH) α -Tokoferol (Vit E) Askorbat (Vit C) β -Karoten Ürat Bilirubin | Albümin Seruloplazmin Transferrin Ferritin Laktoferrin Melatonin Sistein |

Süperoksit dismutaz (SOD)

İlk olarak 1968 yılında Mccord ve Fridovich tarafından tanımlanan, antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 'e ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimidir (Tekkes 2006).

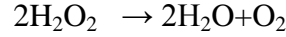


Süperoksit dismutazın katalize ettiği reaksiyonun hızı, spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. İnsanda SOD'nin iki tipi bulunmaktadır; sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn-SOD) (Akkuş 1995). Hücrede en çok bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (Halliwell 1990). Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen, bu enzim sayesinde intrasellüler

süperoksit düzeyleri düşük tutulur. Süperoksit dismutazın ekstrasellüler aktivitesi düşüktür (Akkuş 1995).

Katalaz (CAT)

Katalaz (CAT), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan dört tane hem grubu içeren bir hemoproteindir. Hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya katalizler (Tekkes 2006).



Bu enzim bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş 1995). Daha çok peroksizomlarda lokalizedir. CAT'ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Bast ve ark 1997).

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

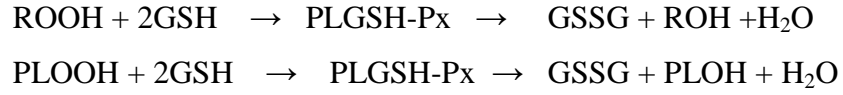
Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Molekül ağırlığı ise yaklaşık olarak 85000 Dalton'dur. Birbirinin aynı dört selenyum atomu ihtiva eden tetramerik bir enzimdir. Monomerik, selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GPx, intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin özellikle sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur (Palliga ve Valentine 1967, Mannervik 1985).

Bu enzimin varlığı ilk defa Mills tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde en etkili enzimdir.

Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. % 25-40'ı ise mitokondridedir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (Tekkes 2006).

GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler.





Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkole indirgeyen fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) da selenyum atomu içerir ve monomerik yapıdadır. Ayrıca sitozolik bir enzimdir. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E'nin yetersiz olduğu durumlarda PLGSH-Px membranın peroksidasyonuna karşı korunmasını sağlar (Akkuş 1995, Mannervik, 1985). Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın (GSSG-R) katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür (Akkuş 1995).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereç

Karaciğer dokusu homojenizasyonunda, sonikasyonun intrasellüler SOD, GPx, CAT enzim aktivitelerine, ayrıca serbest radikal oluşum düzeyinin göstergesi olarak kabul edilen LPO düzeylerine etkilerinin belirlenmesinde postmortem yeterli düzeyde sağlıklı taze dana karaciğeri kullanılmıştır.

Kullanılan Cihazlar

| | | |
|---|---------------------|--|
| 1 | Soğutmalı santrifüj | Universal 32R Hettich (Almanya) |
| 2 | Derin dondurucu | Sanyo (Japon) |
| 3 | Otomatik pipetler | Eppendorf (Almanya) |
| 4 | Spektrofotometre | Shimadzu UV 1201V 2100 (Japonya) |
| 5 | Homojenizatör | Sartorius 37070 (Göttingen/Germany) |
| 6 | Hassas terazi | Shinko denshi (Japon) |
| 7 | Sonikatör | SONIC vibra cells. Amplitude probe S&M 0702 40% of maximum (USA) |

2.2. Yöntem

Doku kan ve benzeri (yağ, fascia, bağlar, lenf vb.) artıklardan temizlendi. Elde edilen karaciğer dokusu % 0,9 NaCl ile yıkandı ve kurutma kağıtları ile kurutuldu. Robotla olabildiğince küçük parçalara ayrıldı ve görünür lifler, damarlar alındı. 0,5' er gr tartıldı ve aliminyum folyo ile sarılıp -86 °C 'ye kaldırıldı. Karaciğer dokusu ve % 0,9 NaCl, soğuk ortamda (+4 °C) muhafaza edildi.

Karaciğer örnekleri (0,5 gr), 5 ml'lik tüplere konuldu (n=15). Üzeri fosfat buffer (pH 7,4)'la 5 ml'ye tamamlandı. Homojenizasyon ve sonikasyon buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen homojenatlar santrifüj tüpüne kanularak 3000 g'de +4°C'de soğutmalı santrifüjde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar dört ayrı eppendorf tüpüne 1'er ml konularak, süpernatantlardan birine Lipit peroksit analizi için 0,5 mM, 10 µl BHT eklendi. Analiz zamanına kadar süpernatantlar -86'ya kaldırıldı. Süpernatant kısmından parametrelerin tayini gerçekleştirildi.

Mekanik homojenizasyon (M): Karaciğer örnekleri 1500 devir/dakika'ya ayarlı homojenizatörle 2 dakika homojenize edildi.

Sonikasyon (S): Karaciğer örnekleri, 5 sn süreli 30 sn soğutmalı 5 kez sonike edildi. Sonikasyon süresinin etkileri için, 2 sn, 4 sn, 6 sn, 8 sn, 10 sn süreli 30 sn soğutmalı 5 kez ultrasound ses dalgaları uygulandı.

Mekanik homojenizasyon ve Sonikasyon (MS): Karaciğer örnekleri öncelikle 1500 devir/dakika' da homojenize edildi, ardından da 5 sn süreli 30 sn soğutmalı 5 kez sonike edildi.

Mekanik homojenizasyon, sonikasyon ve dithioerythritol (MSD): Karaciğer örnekleri üzerine 50 µl dithioerythritol eklenip karıştırıldı, 1500 devir/dakika' da homojenize edildi, ardından da 5 sn süreli 30 sn soğutmalı 5 kez sonike edildi. Dithioeritritol eklenen karaciğer dokularında işlem sırasında gözle görünür biçimde kabarcık (kavitasyon) oluşumu azaldı.

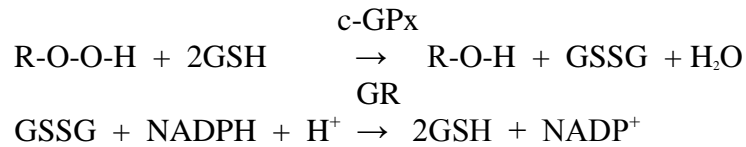
2.2.3. Antioksidan Enzim Aktivite Düzeylerinin Ölçümü

Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeylerinin belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz aktivitesi, ticari GPx-340TM (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202 USA) kiti ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

Prensip

Glutasyon peroksidaz tarafından organik peroksitlerin reaksiyonu sonucu oluşan okside glutatyon, glutatyon redüktaz (GR) tarafından tekrar redükte edilmektedir. Redüksiyon aşamasında NADPH'ın NADP⁺'ya dönüşümü 340 nm'de azalan absorbansa sebep olmakta ve GPx aktivitesi belirlenmektedir. 340 nm'deki absorbans düşüşüyle GPx aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar mU/ g protein olarak verildi.



Kit içeriği: NADPH reagent: beta-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte), glutatyon, glutatyon redüktaz (liyofilize) assay buffer, tert-bütül hidroperoksit

Hesaplama: Üç dk boyunca örnek absorbansları belirlendi ve dakikadaki absorbans farkları hesaplandı (delta absorbans). GPx mU/ml: ((delta absorbans örnek) / 0,00622) X sulandırma katsayısı.

GPx mU/ g protein : (GPx mU/ml) / (g protein/ml).

Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz aktivitesi ticari Catalase-520TM (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202 USA) kiti ile spektrofotometrik (UV 2100 UV-VIS Recording Spectrophotometer Shimadzu, Japonya) olarak belirlendi.

Prensip

Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümü CAT aktivitesi ile doğru orantılıdır. Örnekler bilinen bir konsantrasyonda hidrojen peroksit ile reaksiyona girer, tam olarak 1 dk inkübasyondan sonra sodyum azid ile reaksiyon durdurulur. Geriye kalan hidrojen peroksit, 4-aminophenazone ve 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic asit ile oksidatif reaksiyona girerek belirlenir. 520 nm'deki absorbans düşüşüyle CAT aktivitesi ters orantılıdır. Sonuçlar U/ mg protein olarak verildi.

Kit içeriği: Kromojen olarak fosfat buffer içinde 4-aminofenazon, 3,5-dikloro-2- hidroksibenzensulfonik asit, fosfat buffer, substrat olarak 30% hidrojen peroksit, HRP: Fosfat buffer içinde horseradish peroksidaz, fosfat buffer içinde sample diluent surfactant, substrat diluent fosfat buffer , sodyum azid, standart katalaz (160 U/vial, liyofilize).

Hesaplama: Standartlar kullanılarak 4 noktalı standart eğri oluşturuldu ve lineer grafik elde edilerek belirlenen formülle örnekler U/ml biriminden hesaplandı.

CAT U/mg protein= (CAT U/ml) / (mg protein/ml).

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi RANSOD (RANDOX Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom) ticari kiti ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

Prensip

Ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit anyonları 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorid (I.N.T.) ile reaksiyona girerek kırmızı formazon boyasını oluşturur. Bu reaksiyon SOD ile inhibe olur. Formazon renk yoğunluğunun azalması SOD aktivitesinin yüksekliğini gösterir. 505 nm'deki absorbans ile SOD aktivitesi arasında ters orantı vardır. Sonuçlar U/g protein olarak verildi.

Kit içeriği: Mixed Substrat (Xantin ve 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorid, I.N.T.), buffer (CAPS ve EDTA), ksantin oksidaz, standart, ransod diluent (fosfat buffer).

Hesaplama: Standartlar kullanılarak 4 noktalı standart eğri oluşturularak ve logaritmik grafik elde edilerek belirlenen formülle örnekler U/ml biriminden hesaplanmıştır.

$$\text{SOD U/g protein: (SOD U/ml) / (g protein/ml).}$$

Lipid peroksidasyon (LPO) ürünleri düzeylerinin belirlenmesi

Lipid Peroksidasyon Ürünleri düzeyleri ticari LPO-586TM (OxisResearchTM, Bioxytech, CA, 92202, USA) kiti ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

Prensip

Analiz, 45 °C'ta N-metil-2- fenilindol adlı kromojen maddenin MDA ve 4-hidroksialkenal (LPO) ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Bir mol MDA veya 4-hidroksialkenal, 2 molekül N-metil-2- fenilindol ile asetonitril içinde reaksiyona girmekte ve 586 nm'de dayanıklı bir kromofor meydana getirmektedir. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

Kit içeriği: Asetonitril içinde N-metil-2-fenilindol, metasülfonik asit, MDA standart: Tris-HCL içinde 1,1,3,3-tetramethoksiopropan (TMOP), metanol içinde ferrik demir, BHT- bütile hidroksi toluen (antioksidan olarak örneklere eklendi), asetonitril.

Hesaplama: LPO nmol/ml= (Absorbans örnek-Absorbans örnek blank) / (Absorbans standart-Absorbans blank) X standart konsantrasyonu X sulandırma katsayısı.

LPO nmol/mg protein = (LPO nmol/ml) / (mg protein/ml).

Total protein düzeylerinin belirlenmesi

Total protein düzeyleri Human Diagnostics (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Wiesbaden, Germany) ticari kiti ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Prensip

Kuprik iyonları purple bir kompleks oluşturmak üzere alkali solüsyonda protein ile reaksiyona girer. Bu renkli kompleksin absorbansı örnekteki protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Kit içeriği: Reagent: (Sodyum hidroksid, potasyum sodyum tartarat, bakır sülfat, potasyum iyodür), standart.

Hesaplama: Total Protein mg/1 g KC = (Absorbans örnek/Absorbans standart) X standart konsantrasyonu X sulandırma ve ünite çevirim katsayıları.

2.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizin yapılmasında SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. Sayısal değişkenler 'ortalama ± standart sapma' şeklinde sunuldu. Gruplar arası farklılıklar ANOVA ve Tukey's testi ile değerendirildi. Sonuçların önem dereceleri p<0.05 olarak vurgulandı.

3. BULGULAR

Çalışmada elde edilen GPx, CAT, SOD aktiviteleri ile LPO ve total protein düzeyleri tek tablo halinde gösterildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Sonikasyon ve Mekanik homojenizasyonun, GPx, CAT, SOD aktiviteleri ile LPO ve total protein düzeylerine etkileri.

| Gruplar | n | GPx (mU/ g protein) | n | CAT (U/ mg protein) | n | SOD (U/g protein) | n | LPO (nmol/mg protein) | n | TP (mg/1 g KC) |
|---------|----|---------------------|----|---------------------|----|--------------------|----|-----------------------|----|--------------------|
| M | 12 | 249,59 ± 25,21 d | 13 | 434,27 ± 25,84 a | 10 | 122,99 ± 14,98 c | 9 | 0,21 ± 0,04 ab | 15 | 196,20 ± 7,48 bcd |
| MS | 12 | 288,38 ± 38,45 cd | 12 | 427,02 ± 17,17 a | 12 | 213,09 ± 21,67 abc | 10 | 0,26 ± 0,04 b | 15 | 181,91 ± 3,66 cd |
| S | 12 | 471,06 ± 46,61 bc | 13 | 221,66 ± 17,68 d | 10 | 293,22 ± 24,76 a | 10 | 0,29 ± 0,05 b | 15 | 187,81 ± 14,20 bcd |
| 2sn | 12 | 425,14 ± 45,51 bcd | 13 | 129,99 ± 8,19 d | 10 | 258,46 ± 18,70 ab | 8 | 0,10 ± 0,01 a | 15 | 222,71±14,57 ab |
| 4sn | 13 | 476,22 ± 36,47 bc | 14 | 180,57 ± 20,56 d | 10 | 255,87 ± 24,26 ab | 10 | 0,20 ± 0,02 ab | 15 | 159,11 ± 3,59 de |
| 6sn | 13 | 409,51 ± 31,93 bcd | 10 | 141,42 ± 11,76 d | 7 | 291,36 ± 43,87 a | 10 | 0,23 ± 0,02 ab | 15 | 245,42 ± 6,16 a |
| 8sn | 13 | 300,71 ± 19,86 cd | 13 | 381,07 ± 15,00 ab | 7 | 220,55 ± 32,31 abc | 8 | 0,26 ± 0,05 b | 15 | 136,17 ± 2,73 e |
| 10sn | 13 | 498,80 ± 46,38 b | 13 | 194,66 ± 12,69 d | 10 | 212,45 ± 26,60 abc | 9 | 0,18 ± 0,02 ab | 15 | 192,04 ± 6,23 bcd |
| SD | 13 | 366,11 ± 28,67 bcd | 13 | 169,12 ± 8,99 d | 10 | 122,01 ± 24,23 c | 10 | 0,17 ± 0,01 ab | 15 | 209,33 ± 5,25 abc |
| MD | 13 | 831,87 ± 68,31 a | 13 | 241,75 ± 11,51 cd | 9 | 262,61 ± 47,43 ab | 10 | 0,27 ± 0,02 b | 15 | 143,30 ± 4,34 e |
| MSD | 13 | 424,17 ± 40,84 bcd | 13 | 306,24 ± 19,36 bc | 9 | 148,39 ± 31,11 bc | 9 | 0,18 ± 0,02 ab | 15 | 208,75 ± 9,34 abc |
| p | | * | | * | | * | | * | | * |

* a, b, c, d, e: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir p<0.05.

M : Mekanik homojenizasyon

MS : Mekanik+ sonikasyon

S : Sonikasyon

SD : Sonikasyon+ dithioerythritol

MD : Mekanik+dithioerythritol

MSD: Mekanik+sonikasyon+dithioerythritol

M grubu GPx aktivitesi ($249,59 \pm 25,21$ mU/ g protein), S ($471,06 \pm 46,61$ mU/ g protein), 4sn ($476,22 \pm 36,47$ mU/ g protein), 10 sn ($498,80 \pm 46,38$ mU/ g protein) ve MD ($831,87 \pm 68,31$ mU/ g protein) gruplarına göre önemli düzeyde düşük olarak belirlendi ($p < 0.05$). MD grubu ($831,87 \pm 68,31$ mU/ g protein) diğer tüm gruplar ile kıyaslandığında en yüksek GPx aktivitesini verdi ($p < 0.05$).

CAT aktivitesi yönünden incelendiğinde, M ($434,27 \pm 25,84$ U/mg protein) ve MS ($427,02 \pm 17,17$ U/mg protein) oranının 8 sn grubu ($381,07 \pm 15,00$ U/mg protein) dışında diğer tüm gruplara göre yüksek olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Sonikasyon grubunu incelediğimizde, 8 sn grubu ($381,07 \pm 15,00$ U/mg protein) diğer sonikasyon gruplarına göre (S, 2sn, 4sn, 6sn, 10sn ve SD) en yüksek CAT aktivitesi vermiştir ($p < 0.05$).

M ($122,99 \pm 14,98$ U/g protein), SD ($122,01 \pm 24,23$ U/g protein), MSD ($148,39 \pm 31,11$ U/g protein) gruplarının SOD aktiviteleri, MS ($213,09 \pm 21,67$ U/g protein), S ($293,22 \pm 24,76$ U/g protein), 2sn ($258,46 \pm 18,70$ U/g protein), 4sn ($255,87 \pm 24,26$ U/g protein), 6sn ($291,36 \pm 43,87$ U/g protein), 8sn ($220,55 \pm 32,31$ U/g protein), 10sn ($212,45 \pm 26,60$ U/g protein), MD ($262,61 \pm 47,43$ ab U/g protein) gruplarına göre önemli oranda düşük olarak saptandı ($p < 0.05$).

2sn grubu LPO düzeyleri ($0,10 \pm 0,01$ nmol/mg protein) MS ($0,26 \pm 0,04$ nmol/mg protein), S ($0,29 \pm 0,05$ nmol/mg protein), 8sn ($0,26 \pm 0,05$ nmol/mg protein) ve MD ($0,27 \pm 0,02$ nmol/mg protein) gruplarına göre önemli düzeyde düşük olarak belirlendi ($p < 0.05$).

Total protein yönünden incelendiğinde, 8sn grubu ($136,17 \pm 2,73$ mg/1g KC), 4sn ($159,11 \pm 3,59 \pm 3,59$ mg/1g KC) ve MD ($143,30 \pm 4,34$ mg/1g KC) grupları hariç, diğer tüm gruplara göre belirgin olarak düşük bulundu ($p < 0.05$).

4. TARTIŞMA

Sunulan bu tez çalışmasında, karaciğer antioksidan potansiyelde belirleyici olan glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitelere serbest radikal oluşumunun göstergesi olan lipid peroksid (LPO) düzeylerine sonikasyonun etkileri araştırıldı. Bulguların değerlendirilmesinde direkt konuyla ilgili olarak yeterince çalışmaya rastlanılmadı.

Sonikasyonun etkileri ultrasound ses dalgalarının enerji seviyelerine, yoğunluğuna, uygulama süresine, kesintili-kesintisiz olmasına, uygulama materyaline göre değişir. Hücrelerden veya organellerinden protein veya enzimlerin salınımı sonikasyonun yoğunluğundan etkilendiği gibi enzimler de aktive veya inaktive olabilirler (Bar 1987).

Ultrasound homojenizasyonda ultrasonik kavitasyon ve sonokimyasal reaksiyonlarla ilişkili olarak ısı artışına eşlik eden oldukça reaktif serbest radikaller açığa çıkar (Edmonds ve Sancier 1983). Bu serbest radikallerin ekserisi nano-mikrosaniye düzeyinde çok kısa ömürlüdür. Hidrojen peroksid (H_2O_2) gibi diğer sonokimyasal ürünler ise uzun süreli stabildirler. Eğer hidrojen peroksid (H_2O_2) peroksizomlar gibi subsellüler kompartmanlardan ayrılmazsa ekstrasellüler alanda membran hasarına yol açarlar.

Cordemans (1991) sonikasyonun üretim verimine etkileriyle ilgili olarak (Ph)₂NH' in (Ph)₂NCH₂Ph' ye dönüşümünde mekanik karışımda 48 saat sonunda % 70, sonikasyon uygulamasında ise 1 saat sonunda % 98 verim elde etmiştir.

Sunulan çalışmada mekanik homojenizasyonla elde edilen homojenat içeriği GPx, CAT, SOD, LPO düzeyleri (Çizelge 3.1) sırasıyla $249,59 \pm 25,21$, $434,27 \pm 25,84$, $122,99 \pm 14,98$, $0,21 \pm 0,04$ iken 5 saniye süreli 30 saniye soğutmalı sonikasyonda $471,06 \pm 46,61$, $221,66 \pm 17,68$, $293,22 \pm 24,76$, $0,29 \pm 0,05$ olarak belirlendi. Sonikasyonla homojenizasyonda CAT düzeylerinde düşme ($p<0.05$) görülürken diğer parametrelerin düzeylerinde artma ($p<0.05$) gözlemlendi. Bu değişimlerle ilgili olarak 5 saniye süreli sonikasyonun lipid peroksidasyonunu artırdığı, LPO artışıyla ilişkili olarak homojenizasyonun arttığı söylenebilir.

Ultrasound ses dalgalarının en önemli etkilerinden biri de tepkime hızını artırmasıdır (Thompson ve ark 1999). Barton ve ark (1996), sakkarozun hidrolizinde invertazın, nişasta ve glikojenin hidrolizinde α -amilaz ve amiloglikozidazın aktivitelerine 60W gücündeki ultrasonik banyonun etkilerini araştırdıkları çalışmada ultrasound ses dalgalarının invertaz aktivitesini 0,9 M da % 37, 9 g/L nişasta substrat konsantrasyonunda α -amilazın aktivitesinin % 57, 100 g/L glukojen substrat konsantrasyonunda ise % 6 artırdığını gözlemlemişlerdir.

Sonikasyonun uygulama süresi ve sıklığı farklı etkilere yol açabilmektedir. Kolesterolün *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 tarafından kolestona oksidasyonuna 20 KHz frekansta ultrasound ses dalgalarının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Bar 1988), sonikasyonun kolesterolün kolestona dönüşüm hızını artırdığı, artışın uygulama süresi ile ilişkili olarak değiştiği, 5 saniye süreli sonikasyonda dönüşümün % 99 arttığı, 10 dk süreli ise % 40 azaldığı, sonikasyon süresinin artmasıyla dönüşüm oranının da arttığı maksimuma ulaştıktan sonra ise azalttığı bildirilmektedir.

Takatsuki ve ark (2003) Aleo arboreseent kallus hücrelerindeki H^+ -ATP ase enzim aktivitesine sonikasyonun farklı sürelerdeki etkilerini araştırmak için 28 KHz' lik ultrasonik banyo kullanmışlar. Aleo arboreseent kalluslarının uyarılması için 2, 5, 10, 30 ve 60 sn süreli sonikasyonda yaş ağırlıklar ikinci günün sonunda 2, 5 ve 10 sn' lik uygulamalarda artmış, en hızlı artış 2 ve 5 sn süreli uygulamalarda gözlenmiş, sonikasyon süresi 30 sn ve 60 sn' ye çıkarıldığında ise belirgin bir azalma gözlenmiş.

Liu ve ark (2006) ise Aleo arborescens kalluslarında Ca^{2+} - ATP ase aktivitesine 2 W güçte sürekli ve periyotlu olarak yapılan sonikasyon uygulamalarının 2 sn-10 sn arasındaki sürelerde düzenli olarak aktivite artışı, buna karşın 10 W güçte yapılan sürekli sonikasyonda 2-10 sn aralığında aktivitenin azaldığını gözlemlemişlerdir. Plasma membranı Ca^{2+} - ATP ase aktivesini 2 W' lık düşük yoğunluklu ultrasound artırırken, yüksek yoğunluklu 10 W' luk inhibe etmiştir.

Erte (2007) abiyotik uyarıcı olarak 20 KHz frekansta sonikasyonun siyah üzümde (*vitis vinifera L.*) resveratrol verimine etkileriyle ilgili olarak periyotlu (P01

ve P05) uygulamanın sürekli uygulamaya göre, periyotlu uygulamada da P01 uygulmasının daha etkili olduğunu bildirmektedir.

Sonikasyon sürelerinin enzim aktivitelere etkileriyle ilgili olarak araştırma da 2 sn süreli sonikasyonda GPx aktivitesi $425,14 \pm 45,51$ (mU/ g protein), 4 sn' de $476,22 \pm 36,47$ (mU/ g protein)' ye, CAT aktivitesi $129,99 \pm 8,19$ (U/ mg protein)' dan $180,57 \pm 20,56$ (U/ mg protein) yükselirken, SOD aktivitesinde değişim gözlenmedi. GPx aktivitesi 6-8 sn de aktivite azalırken, CAT 6 sn' de azaldı, 8 sn' de arttı, 10 sn' de düştü. SOD aktiviteleri 6 sn de artarken 8 sn, 10 sn de azaldı. Sonikasyon süresinin enzim aktivitelere etkileriyle ilgili olarak en yüksek aktivite artışı GPx' de 10 sn, CAT' da 8 sn, SOD' da 6 sn de, LPO artışı 8 sn de gözlemlendi. LPO artışının yüksek olduğu 8 sn, GPx aktivitesindeki düşüş, 10 sn deki GPx deki yüksek değerler ise LPO daki düşüş oldukça anlamlıdır. Bulgular Barton ve ark (1988), Takatsuki ve ark (2003), Liu ve ark (2006) ve Erte (2007) sonuçlarıyla benzerlikler göstermektedir.

Ultrasound homojenizasyonda mekanik homojenizasyonla ilgili gruplardan daha yüksek olarak gözlemlenen GPx ve SOD enzim aktivitelerinin ultrasonik kavitasyon ve sonokimyasal reaksiyonlarda reaktif serbest radikal artışıyla (Edmonds ve Sancier 1983) ilişkili olabilir.

Sonikasyonda serbest radikallere karşı koruyucu olarak redükleyici maddeler kullanılabilir. Dithioerythritol (0,25-0,5 mM) enzim aktivite azalmasını önler (Nakamura 1974). Armour ve Corry (1982) Chenese hamster ovaryum hücre kültüründe 1.07 MHz' lik 15 dk süreli sonikasyonda 50 mM Cysteamine'nin serbest radikalleri etkisizleştirdiğini bildirmektedir.

Yapılan çalışmada sonikasyon süresi ile ilişkili olarak LPO düzeylerinin arttığı, M' de $0,21 \pm 0,04$ (nmol/mg protein) olan LPO düzeylerinin MS ve S de $0,26 \pm 0,04$ $0,29 \pm 0,05$ (nmol/mg protein)' ye yükseldiği, dithioerythritollü gruplardan SD' ye $0,17 \pm 0,01$ (nmol/mg protein), MSD' de ise $0,18 \pm 0,02$ (nmol/mg protein) azaldığı belirlendi. Sonikasyonda serbest radikallere karşı koruyucu görünen dithioerythritolün MD'li grupta $831,87 \pm 68,31$ (mU/ g protein) yüksek GPx aktivitesinin interferezden kaynaklanabileceği kanısındayız.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak karaciğer dokusunun homojenizasyonunda sonikasyonun GPx, SOD aktivitelerini ve LPO düzeylerini arttırdığı, uygulama süresinin enzim aktivitelerini farklı düzeylerde etkilediği, sonikasyonun etkilerinin enzime göre değiştiği, dithioerythritolün LPO artışını önlediği bu sebeple homojenizasyon örneklerine düşük konsantrasyonlarda (<0,5 mM) dithioerythritolün katılması önerilebilir.

6. ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ultrasound Homojenizasyonun Karaciğer Süperoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz, Katalaz Enzim Aktivitelerine ve Lipit Peroksit Düzeylerine Etkileri

Deniz SAĞLAM
Biyokimya (VET) Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA- 2011

Bu çalışmada; Ultrasound homojenizasyonun karaciğer SOD, GPx, CAT enzim aktivitelerine ve LPO düzeylerine etkileri araştırıldı.

Materyal olarak sağlıklı postmortem taze dana karaciğeri kullanıldı. Gruplara ayrılan 0.5' er gramlık karaciğer örneklerinde mekanik ve 2 sn, 4sn, 5 sn, 6 sn, 8 sn, 10 sn süreli ultrasound homojenizasyon, mekanik + ultrasound homojenizasyon yapıldı. Süpernatant homojenizasyon örneklerinde GPx, SOD, CAT enzim aktiviteleri ve LPO düzeyleri spektrofotometrik metotla belirlendi.

Sunulan çalışmada mekanik homojenizasyonla elde edilen homojenat içeriği GPx, CAT, SOD, LPO düzeyleri sırasıyla $249,59 \pm 25,21$, $434,27 \pm 25,84$, $122,99 \pm 14,98$, $0,21 \pm 0,04$ iken 5 saniye süreli 30 saniye soğutmalı sonikasyonda $471,06 \pm 46,61$, $221,66 \pm 17,68$, $293,22 \pm 24,76$, $0,29 \pm 0,05$ olarak belirlendi. Sonikasyonla homojenizasyonda CAT düzeylerinde düşme ($p<0.05$) görülürken diğer parametrelerin düzeylerinde artma ($p<0.05$) gözlemlendi. Bu değişimlerle ilgili olarak 5 saniye süreli sonikasyonun lipit peroksidasyonunu artırdığı, LPO artışıyla ilişkili olarak homojenizasyonun arttığı söylenebilir.

Sonuç olarak; Ultrasound homojenizasyonun (2 sn, 4 sn, 5 sn) GPx, SOD enzim aktivitelerini ve LPO düzeylerini artırdığı, sonikasyon süresinin enzim aktivitelerini farklı düzeylerde etkilediği, sonikasyonun etkilerinin enzime göre değiştiği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: Homojenizasyon; Sonikasyon; Karaciğer.

7. SUMMARY

The Effects of Ultrasound Homogenization on the Activities of Superoksit Dismutaz, Glutatio Peroxidaz, Catalase and Levels of Lipid Peroxide in Liver

In this study, effects of ultrasound homogenisation technique on the activities of SOD, GPx and CAT and levels of LPO in liver were investigated.

Postmortem healthy fresh beef liver was used as the material. Liver was sliced and grouped (0,5 g for each) as mechanic group, 2, 4, 5, 6, 8 and 10 sec ultrasound groups, and mechanic+ultrasound group. Activities of SOD, GPx and CAT and levels of LPO were measured in supernatant of homogenised samples by spectrophotometric methods.

In the study, GPx, CAT, SOD and LPO levels were $249,59 \pm 25,21$, $434,27 \pm 25,84$, $122,99 \pm 14,98$, $0,21 \pm 0,04$ in mechanical homogenisation group, respectively where in 5 sc - 30 sc cooling sonication group they were as $471,06 \pm 46,61$, $221,66 \pm 17,68$, $293,22 \pm 24,76$, $0,29 \pm 0,05$, respectively. Cat levels were decreased and all the other parameters were increased by sonication and homogenisation ($p < 0.05$). As a conclusion, it can be suggested that, 5 sc sonication process increased LPO levels, thus, as regards LPO, homogenisation may be more successful.

It was found that, ultrasound homogenisation (2, 4, 5 sec) increased liver GPx and SOD activities and LPO levels, different sonication application affected enzyme activities at different degrees and enzymes are affected from sonication differently.

Key Words: Homogenisation; Sonication; Liver

8. KAYNAKLAR

1. Aalt B, Haenen RM, Doelman JA. Oxidants and Antioxidants: state of the art. *Am. J Med.* 1991; 91 :3-13.
2. Adewuyi Y,G. Sonochemistry: Enviromental Science and Engineering. *Ind.Eng. Chem. Res.* 2001;40: 4681-4715.
3. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, Kuzucular ofset, 1995; Konya.
4. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara tıp mecmuası* 1995; 48: 253-262.
5. Altınışık M. Organik kimya ve biyokimyaya giriş. Erişim: http://www.mustafaaltınışık.org.uk/89_1_01.pdf. Erişim tarihi: 15.03.2009.
6. Armour PE and Corry MP. Cytotoxic effects of ultrasound in vitro dependence on gas content, frequency, radical scavengers and attachment. *Radiation Research.*1982; 89: 369-380.
7. Bar R. Ultrasound Enhanced Bioprocesses, in: *Biotechnology and Engineering*, 1987; 32: 655-663.
8. Bar R. Ultrasound Enhanced Bioprocesses: Cholestrol Oxidation by *Rhodococcus erytropolis*. *Biotechnology and Bioengineering.* 1988; 32: 655-663.
9. Barber D, Haris S. Oxyigen free radicals and antioxidants:a review. *Am Pharm.* 1994; 34: 26-35.
10. Barton S, Bullock C and Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Tecnology.* 1996; 18:190-194.
11. Bast A, Haenen GR, Van den Berg R, Van den Berg H. Antioksidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res* 1998; 68:399-403.
12. Bilesim.com. tr. Ultrasound uygulamaları. <http://www.bilesim.com.tr>. Erişim tarihi:12.02.2008
13. Cordemans E. Ultrasound A New Performance Tool For The Chemical Industry. *Chimicaoggi, Undatim Ultrasonics* 10, 1991; November 17-20.
14. Dinç DA. Ultrason fiziği ve ineklerde reproduktif ultrasonografi. Pozitif maatbacılık limited şirketi. Ankara. 2008; syf: 22-39.
15. Edmonds PD and Sancier KM. Evidence for free radical production by ultrasonic cavitation in biological media. *Ultrasound Med. Biol.* 1983; 9: 635-639.
16. Erte E. Siyah üzümde (*vitis vinifera L.*) bulunan resveratrolün üretim veriminin artırılmasına ses ötesi dalgaların etkisi. Yüksek lisans tezi . AÜ. Fen bilimleri enstitüsü. 2007; syf: 40-88.
17. Gümüşdere HT. Zararlı organik bileşiklerin bozundurulmasına ses ötesi dalgaların (Ultrasound) etkisi. Yüksek lisans tezi . AÜ. Fen bilimleri enstitüsü. 2007; syf: 24-38.
18. Gürbüz DG. Demir eksikliği anemisinde intravenöz demir tedavisinin total antioksidan kapasite üzerine etkisi. Uzmanlık tezi 2008; syf: 18-35.
19. Halliday D and Resnick R. 'Fiziğin Temelleri-1', (Çeviren: Prof. Dr. Cengiz Yalçın), Arkadaş kitapevi, 3. baskı, 1992; 368-369.
20. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1990; July 280(1): 1-8.

21. Karabiga M, Kiriş İ, Yılmaz N, Altuntaş İ, Karahan N, Okutan H. Aprotinin deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde böbrek hasarına etkisi. *Trkish J Vasc. Surg.* 2007; 16(5):9-18.
22. Kavutçu AD. Ultrason dalgaların fare böbrek dokusuna etkisi. Yüksek Lisans tezi. GÜ. Fen bilimleri enstitüsü. 2006; syf: 59-62.
23. Kiriş İ, Okutan H, Savaş Ç, Yönden Z, Delibaş N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. *Trkish J Vasc. Surg* 2005; 14(2): 13-18.
24. Ley SV and Low CMR. 'Ultrasound in Synthesis', Springer-Verlag, Berlin 1989; 1.
25. Liu Y, Yang H, Takatsuki H, Sakanishi A. Effect of ultrasonic exposure on Ca^{2+} -ATP ase activity in plasma membrane from *Aleo arborescens* callus cells. *Ultrasonics Sonochemistry.* 2006; 13: 232-236
26. Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1985; 133:490-5.
27. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet. Fak. Derg.* 2004; 15(1-2):91-96.
28. Nakamura W, Hosoda S and Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1974; 358: 251-261.
29. Nirosoavi. com. tr. High pressure homogenization technology. Erişim: [http:// www. nirosoavi. com/high-pressure-homogenization-technology.asp-16](http://www.nirosoavi.com/high-pressure-homogenization-technology.asp-16). Erişim:10.04.2009.
30. Öner E. Ultrasonik enerjinin tekstil endüstrisinde kullanımı. *Sonokimya.* 2002.
31. Palliga DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocte glutathione peroxidase. *J Lab. Clin Med. Jul.* 1967; 70(1): 158-69.
32. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem* 1993; 62: 797-821.
33. Surgun Y. Homojenizasyon ve parçalama yöntemleri. [http://www. mu edu.tr/departmens/biyoloji/MUbiyoweb/molbio/konu3. ppt](http://www.mu.edu.tr/departmens/biyoloji/MUbiyoweb/molbio/konu3.ppt). Erişim tarihi: 27.03.2009.
34. Suslick KS. *Ultrasound: Its chemical, physical and biological effects.* VCH Publishers. New York. 1988; 1:129-130.
35. Şendağ S. Kangal ırkı köpeklerde erken gebeliğin ve fetal gelişmenin real-time ultrasonografi ile belirlenmesi. Doktora tezi. SÜ. Sağlık bilimleri enstitüsü. 2002; syf: 3-17.
36. Takatsuki H, Liu Y, Yoshikoshi A, Wang B and Sakanishi A. Effects of ultrasound on the growth and vakoular H^{+} -ATP ase activity of *Aleo Callus Cells*. *China.* 2003; 32: 105-116.
37. Tekkes Y. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitaminin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek lisans tezi. KSiÜ. Fen bilimleri enstitüsü. 2006; syf: 2-26.
38. Thompson HL and Doraiswamy KL. *Sonochemistry: Science and engineering.* *Ind.Eng. Chem. Res.* 1999; 38: 1215-1249.

9. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Aksaray Ortaköy’de doğdu. İlköğrenimini Osman Apacık İlkokul’unda, orta öğrenimini Ortaköy Sağlık Meslek Lisesi Tıbbi Sekreterlik Bölümünde tamamladı. Fırat Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu Sağlık Memurluğu Bölümü’nü 2002 yılında kazandı ve 2003 yılında Niğde Üniversitesi Aksaray Meslek Yüksekokulu’na yatay geçiş yaptı ve 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi’nde hemşire olarak çalışmaya başladı. Halen aynı kurumda hemşire olarak çalışmaktadır.